

FUNKTIONELLE LANGZEITEFFEKTE KORTIKALER SPREADING DEPRESSIONS

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl. Biol. Anja Urbach
geboren am 13. November 1974 in Erfurt

Jena, den 05.06.2006

Gutachter:

1. Prof. Dr. O.W. Witte
Klinik für Neurologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. J. Bolz
Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. U. Dirnagl
Klinik für Neurologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
Leao's Spreading Depression	1
Theorien zu Entstehungs- und Ausbreitungsmechanismen der SD	2
Elektrophysiologische Veränderungen und Ionenverschiebungen	3
Metabolische Konsequenzen und hämodynamische Effekte	4
Einfluss von SD auf die Genexpression	6
Pathophysiologische Bedeutung von SD	6
SD und Perinfarktdepolarisationen	6
SD und Ischämietoleranz	7
Hinweise auf SD im menschlichen Gehirn – Relevanz für Migräne, Schädel-Hirn-Trauma und Schlaganfall	7
Neurogenese im adulten Gehirn	9
 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	 13
 MATERIAL UND METHODEN	 14
Versuchstiere	14
Projekt 1: Genexpressionsstudie	14
Induktion der Spreading Depressions (SD) und elektrophysiologische Ableitungen	14
RNA Isolierung	15
Genexpressionsanalyse mittels Affymetrix Microarrays	16
Erzeugung der Kandidatengen-Listen	18
Quantitative RT-PCR	19
Immunhistochemie (Peroxidase Technik) und Immunfluoreszenz	21
Projekt 2: Neurogenesestudie	23
Induktion der Spreading Depressions (SD), MK-801-Injektion und elektrophysiologische Ableitungen	23
Induktion der photothrombotischen Läsionen (PT)	24
Bromodeoxyuridin-Injektionen	25
Gewebepräparation	26
BrdU-Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	26
Volumetrie	27
Quantifizierung und statistische Analysen	28
Projekt 3: Verhaltenstests	29
Traditionelles Morris Water Maze	29
Modifiziertes Morris Water Maze	31
Statistik	33

ERGEBNISSE	35
Projekt 1: Genexpressionsstudie	35
Ergebnisse der Transkriptomanalyse	35
Datenvalidierung	43
Quantitative RT-PCR von gepoolten und Einzelproben	43
Proteinexpression	44
Projekt 2: Neurogenesestudie	48
Kortikale SD steigern die Anzahl neugeborener Zellen im adulten Gyrus dentatus	48
Kortikale SD steigern die Neuroneogenese im adulten Gyrus dentatus	51
Hippocampale Neurogenese nach kortikalen photothrombotischen Infarkten	53
Volumetrische Analyse	54
Korrelation des histologischen Schadens im zerebralen Kortex mit der Neurogeneserate im Gyrus dentatus	55
Projekt 3: Verhaltenstests	57
Standard Morris Water Maze	57
Modifiziertes Water Maze	60
DISKUSSION	63
Differentielle Genexpression nach kortikaler SD	63
Kann die Microarray-basierte Genexpressionsanalyse einen repräsentativen Überblick über die molekularen Veränderungen nach SD geben?	63
SD reguliert unterschiedliche funktionelle Gruppen von Genen über einen langen Zeitraum hinweg	66
Mögliche Schlussfolgerungen zur SD-vermittelten Ischämietoleranz	70
Vergleich der Genexpressionsmuster nach SD und Schlaganfall	71
Hippocampale Neurogenese und räumliches Lernen	73
Kortikale SD steigern die hippocampale Neuroneogenese – Spekulationen zum Mechanismus der Infarkt-vermittelten Neurogenese	75
Die kortikale Läsion per se – (k)ein Modulator hippocampaler Neurogenese?	80
BrdU als Proliferationsmarker	81
Funktionelle Relevanz der gesteigerten Neurogenese im Gyrus dentatus	81
ZUSAMMENFASSUNG	84
REFERENZEN	86
ANHANG	I
DATEN DER MICROARRAY-EXPRESSIONSANALYSE	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
PUFFER UND CHEMIKALIEN	XI
Injektionen, Perfusion und histologische Färbungen	XI

<i>OP und Präparation</i>	XIII
<i>Molekularbiologische Analysen</i>	XIV
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	XVI
DANKSAGUNG	XVII
LEBENS LAUF	XVIII
EIGENE PUBLIKATIONEN	XIX

Die Philosophie steht in diesem riesigen Buch geschrieben, das uns ständig offen vor Augen liegt (...). Aber man kann es nicht verstehen, wenn man nicht zuvor die Sprache lernt und die Schriftzeichen kennt, in denen es geschrieben ist ... Ohne diese Mittel ... ist es ein vergebliches Umherirren in einem dunklen Labyrinth.

Galileo Galilei

- meiner Familie -

EINLEITUNG

Der Begriff der Spreading Depression (SD) wurde 1944 durch den brasilianischen Physiologen Aristides A. P. Leao geprägt. Er beobachtete nach elektrischer Stimulation des Kaninchenkortex eine transiente Reduktion der spontanen elektrischen Aktivität („*spreading depression of the spontaneous cortical activity*“), die sich mit 2-5 mm/min vom Ort der Stimulation in alle Richtungen über den Kortex ausbreitete [1], (Abb. 1A). Gleichzeitig registrierte er in den betroffenen Arealen Änderungen des kortikalen Gleichspannungspotentials [6]. Leao war auch der erste, der die mit SD einhergehenden Blutflussveränderungen beschrieb [12] und zusammen mit R. S. Morisson SD als neurophysiologisches Korrelat des wandernden Flimmerskotsoms bei Migränepatienten vermutete [13]. Die Physiologie der SD und ihre Bedeutung für die Funktion des Gehirns sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Es wurde lange vermutet und besonders in den letzten 20 Jahren verdichteten sich die Hinweise, dass SD mit einer Reihe neurologischer Erkrankungen, wie der Migräne [15], dem Schlaganfall [16] oder dem Schädel-Hirn-Trauma [18, 19] assoziiert sind. Es bleibt jedoch nach wie vor offen, inwieweit SD zur Pathophysiologie dieser Krankheiten beitragen.

Leao's Spreading Depression

Spreading Depression (SD) können tierexperimentell durch chemische (anorganische Ionen, wie K^+ , Rb^+ ; metabolische Inhibitoren, z.B. Ouabain; depolarisierende Aminosäuren, wie Glutamat oder Aspartat), mechanische (Nadelstich, Berührung mit stumpfen Gegenstand) oder elektrische Reizung ausgelöst werden [1, 13, 20]. Sie lassen sich nicht nur im zerebralen Kortex, sondern in der grauen Substanz nahezu jeder Region des zentralen Nervensystems induzieren [20]. Es gibt jedoch eine klare Prädisposition für Areale mit hoher Neuronendichte. Auch das Alter ist von entscheidender Bedeutung, im adulten Gehirn lassen sich SD bedeutend einfacher auslösen als in jungem Gewebe [22]. Dies hängt möglicherweise mit der altersbedingten Schrumpfung des Interstitiums oder der Reifung der Transmittersysteme zusammen. Nach wie vor ist nicht geklärt, warum SD ohne weiteres bei lissenzephalen Tieren, aber mit zunehmenden Grad kortikaler Gyrierung immer schwieriger auslösbar sind [22]. Bei gyrenzephalen Tieren stellen größere Furchen anatomische Grenzen für die

Ausbreitung von SD dar, während sie sich im ungefurchten Gehirn über den gesamten ipsilateralen Kortex ausbreiten.

Theorien zu Entstehungs- und Ausbreitungsmechanismen der SD

Bis heute sind die Mechanismen, die zur Entstehung und Ausbreitung von SD führen, nicht zufriedenstellend aufgeklärt. Der erste Erklärungsansatz – van Harreveld's Asphyxie-Hypothese – wurde unmittelbar wieder verworfen. Er vermutete, dass SD durch eine sich wellenförmig über den Kortex ausbreitende Vasodilatation verursacht werden, die durch Abfall des Sauerstoffpartialdrucks zum Stillstand der kortikalen Aktivität führt [23]. Noch im selben Jahrzehnt wurden zwei weitere Theorien entwickelt: Grafstein's Kalium-Hypothese und van Harreveld's Glutamat-Hypothese. Grafstein postulierte 1956 basierend auf einer Reihe von Experimenten, dass es initial durch starke neuronale Aktivität zu einem massiven Anstieg der extrazellulären K^+ -Konzentration kommt, welche zu einer weiteren Depolarisation und schlussendlich Inaktivierung der Neuronen führt, aus denen K^+ freigesetzt wurde. Gleichzeitig diffundiert ein Teil des akkumulierten K^+ zu benachbarten Zellen und bewirkt deren Depolarisation, usw. [24]. Dies nahm sie als kritisches Ereignis für die Selbstausbreitung von SD an. Drei Jahre später wurde die Glutamat-Hypothese durch van Harreveld aufgestellt [25]. Er vermutete, dass Glutamat als exzitatorische Substanz zur Ausbreitung von SD beiträgt. Diese Hypothese wird durch Studien gestützt, die zeigen konnten, dass es durch SD zu einer Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration kommt [26] und dass sich SD durch NMDA-Rezeptorantagonisten blockieren lassen [27, 28]. Es gibt jedoch auch eine Reihe von Untersuchungen, die die Gültigkeit dieser Theorien in Frage stellen. Unter anderem sprechen zwei Befunde gegen Grafstein's Hypothese: Erstens sind SD nicht durch Tetrodotoxin blockierbar, somit scheint neuronale Aktivität nicht ausschlaggebend für die Auslösung von SD zu sein [29]. Zweitens ließe die Theorie erwarten, dass der SD-Welle (DC-Potentialänderungen) eine Erhöhung des extrazellulären K^+ vorausgeht, auch dies konnte nicht bestätigt werden - beide Phänomene treten simultan auf [30]. Die Notwendigkeit einer erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentration zur Auslösung und Ausbreitung einer SD-Welle erscheint inzwischen ebenfalls zweifelhaft [31]. Neuerdings wird ein transzellulärer Ausbreitungsmechanismus über *gap junctions* diskutiert [33, 34]. Basierend auf diesen und neueren Arbeiten [35, 36], entwickelte Nedergaard ein Modell, welches die Beteiligung von Kalziumwellen an der Initiation und Ausbreitung von SD beschreibt [37].

Zusammengenommen ist die Kausalkette der Ereignisse, die zur Generierung und Ausbreitung einer SD führen, bis heute nicht schlüssig aufgeklärt. Der Prozess scheint sehr viel komplexer, als von Grafstein und van Harreveld angenommen, und auf einer Kaskade von Ereignissen zu beruhen. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick der heute allgemein akzeptierten Theorien zur Physiologie und Ausbreitung von SD geben (Abb. 1).

Elektrophysiologische Veränderungen und Ionenverschiebungen

Aufgrund der massiven simultanen Depolarisation der Zellen des Hirnparenchyms kommt es während der SD zu einer deutlichen Negativierung des Gleichspannungspotentials (DC) um 5 bis 20 mV [1, 24]. Dieses kehrt sich nach 1-2 min um (Repolarisation) und geht in eine schwache, 3-5 min dauernde Positivierung (Hyperpolarisation) über (Abb. 1C). Gelegentlich geht der Negativierung eine kleinere positive Welle voran [6, 20]. Am Beginn der DC-Potentialänderungen steht gewöhnlich ein kurzer, 2-3 s dauernder Anstieg neuronaler Aktivität (*population spikes, burst of single unit activity*) [24], gefolgt von 1-2 min absoluter „Stille“ [20]. Damit verbunden tritt eine vorübergehende Depression der spontanen EEG-Aktivität ein, welche erst nach etwa 5 -10 min vollständig wiederhergestellt wird [1].

Diesen elektrophysiologischen Phänomenen liegen drastische Verschiebungen intra- und extrazellulärer Ionengradienten zugrunde [20, 22]. Durch eine initiale Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[K^+]_e$) von 3 mM auf etwa 10-12 mM kommt es zur Depolarisation von Neuronen und Gliazellen. Dies zieht einen weiteren Anstieg der $[K^+]_e$ auf etwa 60-70 mM nach sich und führt zur Öffnung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen in den präsynaptischen Terminalen, so dass Kalzium-Ionen in die Zellen einströmt. Folglich werden exzitatorische und inhibitorische Neurotransmitter freigesetzt. Glutamat aktiviert rezeptorgekoppelte Kationenkanäle an den postsynaptischen Membranen der Nachbarzellen, wodurch Natrium- und Kalzium-Ionen einströmen und zu deren Depolarisation führen. Die inhibitorischen Transmitter öffnen Anionenkanäle und verursachen dadurch einen Einwärtsstrom von Chlorid. Im Zuge dessen kommt es zu einem Abfall der $[Ca^{2+}]_e$ von 1.3 auf etwa 0.07 mM, der $[Na^+]_e$ von ca. 150 auf etwa 60 mM und der $[Cl^-]_e$ von etwa 130 auf ca. 70 mM [20, 38, 39], (Abb. 1B). Den Ionenverschiebungen folgt freies Wasser nach, was ein Anschwellen der Zellen und eine Schrumpfung des Extrazellulärraums um ca. 50 % verursacht [40, 41]. Unter normoxischen Bedingungen und adäquater Glukoseversorgung kehren die meisten Ionenkonzentrationen innerhalb einer Minute zu ihren Ausgangswerten zurück [15].

In diese Prozesse sind sowohl Neuronen als auch Gliazellen involviert. Letztere sind beispielsweise an der Entfernung von überschüssigem K^+ aus dem Extrazellulärraum (*clearance*) und dessen Transport in benachbarte Bereiche beteiligt (*spatial buffering*) [42, 43]. Zudem ist ein Teil des freigesetzten Glutamats glialen Ursprungs [22, 43].

Metabolische Konsequenzen und hämodynamische Effekte

Grafstein wies bereits 1956 nach, dass die Erholung von SD ein oxidativer, energiefordernder Prozess ist [24]. Insbesondere nach repetitiven SD benötigen die Zellen zusätzliche Energie für die Restitution der transmembranalen Ionengradienten. Dies spiegelt sich in einer Verdopplung des Glukoseverbrauches und einem um 50 % erhöhten Sauerstoffverbrauch wider [44, 45], der Glukosetransport aus dem Blut ins Gewebe nimmt zu [45]. Ein Teil der Glukose wird anaerob verstoffwechselt, was einen Anstieg der Lactatkonzentration um etwa 100 % und einen vorübergehenden Abfall des pH-Wertes mit sich bringt [46, 47]. Diese Prozesse gehen mit einer vorübergehenden Reduktion der energiereichen Substrate Phosphokreatin (um > 40 %), Glykogen (um ca. 30 %) und ATP einher [47-49]. Durch den Anstieg der oxidativen Phosphorylierung sinkt das $NADH/NAD^+$ -Verhältnis während der Repolarisation des Gewebes [44, 50], (Abb. 1B).

Die beschriebene metabolische Aktivierung während SD ist für 1 - 3 min mit einer Vasodilatation und einem Anstieg des regionalen zerebralen Blutflusses um bis zu 250 % gekoppelt [51]. Daran schließt sich eine etwa eine Stunde anhaltende Vasokonstriktion mit Verminderung des Blutflusses um 20 - 30 % an [51-53], (Abb. 1B).

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Veränderungen führen SD auch zu Modifikationen der Proteinsynthese. Krivanek zeigte bereits 1970, dass es unmittelbar nach SD zu einer transienten Verminderung der ipsilateralen Proteinsynthese ($[^{14}C]$ Leucin-Einbau) kommt. Diese erreicht ihr Minimum eine Stunde nach SD und kehrt in den folgenden fünf Stunden zum Ausgangslevel zurück [54]. Dieser Befund wurde durch nachfolgende Studien bestätigt [55], so dass allgemein angenommen wurde, dass SD, vermutlich aufgrund des erhöhten Energieverbrauches für die Restoration der Ionenhomeostase, zu einer generellen Verminderung der Eiweißsynthese führen. Kawahara *et al.* konnten jedoch später zeigen, dass SD langfristig zu einer Erhöhung der ipsilateralen Proteinsynthese führen (am Tag 3) [56]. Immunhistochemische Studien identifizierten eine Reihe von Proteinen (Cox-2,

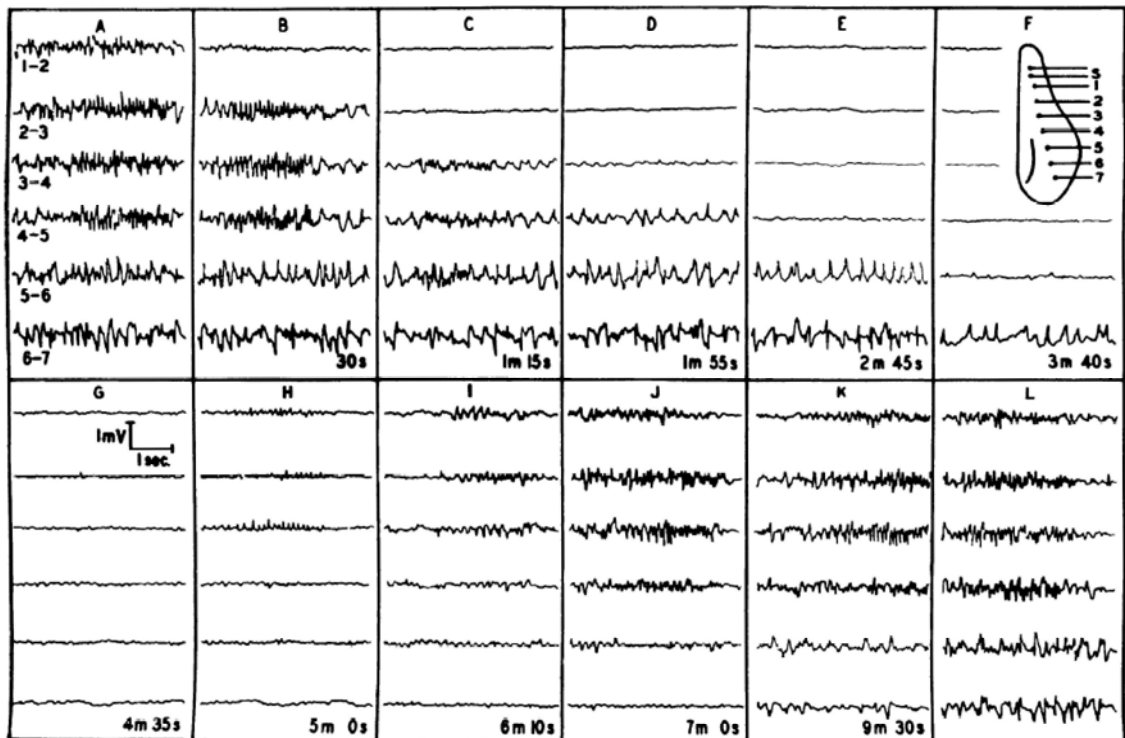
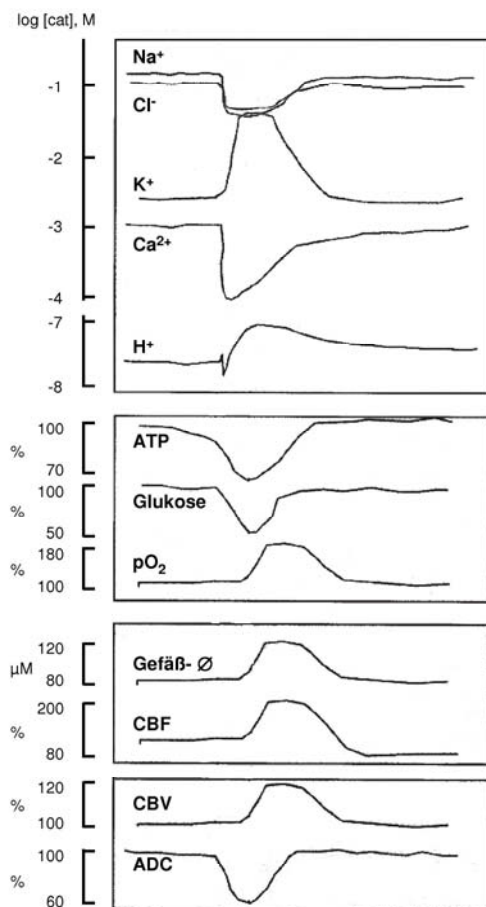
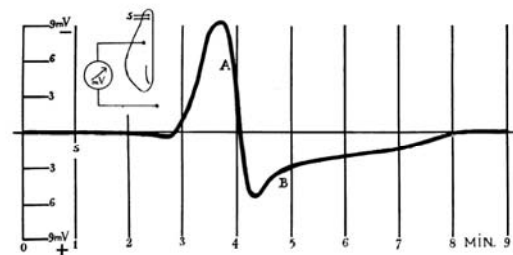
A**B****C**

Abb. 1 Änderungen physiologischer Parameter während einer Spreading Depression (SD). (A) Leao's originale Illustration einer SD von 1944 [1]. Die Spuren zeigen eine räumlich und zeitlich aufgelöste elektrokortikographische Ableitung vom Kaninchenkortex nach elektrischer Stimulation. Im Schema rechts oben sind die Positionen der Stimulations- (S) und Ableitelektroden eingezeichnet. (B) Änderungen der Elektrolytkonzentrationen, metabolischer Parameter und des Blutflusses, modifiziert nach [5]. (ADC = Wasserdiffusionskoeffizient; ATP = Adenosintriphosphat; CBF = zerebraler Blutfluss, CBV = zerebrales Blutvolumen; Glukose = interstitielle Glukosekonzentration; pO_2 = Sauerstoffpartialdruck; \varnothing = Durchmesser;). (C) zeigt die mit einer SD assoziierte Veränderung des DC-Potentials; aus Leao 1947 [6].

BDNF, hsp27, GFAP etc.), deren Abundanz zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach SD parallel zu der der entsprechenden Transkripte zunahm [10, 56-61].

Einfluss von SD auf die Genexpression

Neben den bisher beschriebenen elektrophysiologischen und metabolischen Veränderungen münden SD auch in einer Beeinträchtigung der Genexpression. Beispielsweise werden unmittelbar nach SD eine Reihe von *immediate early* Genen (z.B. *c-Fos*, *c-Jun*), Hitzeschockproteinen (z.B. *hsp27*, *hsp32*) oder inflammatorischen Genen (z.B. *MCP-1*, *Cox-2*) induziert [21, 57, 61-63]. In weiteren Studien konnte die Expression von Genen, welche für Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren kodieren (z.B. *BDNF*, *bFGF*, *trkB*), belegt werden [64-66]. Andere Arbeiten zeigten eine Heraufregulation von *GFAP* in Astrozyten und eine Beeinflussung von Genen, die für vasoreaktive Proteine oder Neurotransmitter kodieren [10, 59, 67-69].

Pathophysiologische Bedeutung von SD

SD und Periinfarktdepolarisationen

Nach experimentell induzierten fokalen ischämischen Hirninfarkten treten, vermutlich durch die anoxische Freisetzung von Kalium-Ionen und Glutamat aus dem Infarktkern, repetitive SD-ähnliche Periinfarktdepolarisationen (PID) auf [70-72]. Diese pflanzen sich vom Rand des infarzierten Gewebes über die Penumbra¹ bis hinein in benachbarte normoxische Regionen fort. Während jedoch SD im normal perfundierten Gehirn keinen anatomischen Schaden verursachen [73], führen repetitive PID durch den gesteigerten metabolischen Stress zu einer sekundären Expansion des irreversibel geschädigten Infarktgebietes auf Kosten der Penumbra [71, 74]. Hierbei gibt es eine lineare Korrelation zwischen der Anzahl der PID und dem finalen Infarktvolumen [74]. Lange wurde angenommen, dass PID hauptsächlich in den ersten 5-6 Stunden nach einer fokalen Ischämie auftreten, neuere Studien zeigten jedoch, dass es nach einer Pause von mehreren Stunden zu einer zweiten Phase von PID kommt, die bis zu einem Tag anhalten und zur sekundären Reifung des Infarktes beitragen [75].

¹Penumbra = der den Infarktkern umschließende Hirnbereich mit eingeschränkter Blutversorgung, jedoch vorhandenem Energiestoffwechsel; die hier auftretenden ischämischen Schädigungen sind potentiell reversibel

Studien nach experimentell induzierter fokaler Ischämie in Ratten zeigten eine differentielle Genexpression sowohl im ischämischen Kortex, als auch in entfernten normoxischen Gebieten (*remote*). Es wurde angenommen, dass die meisten dieser ipsilateral *remote* auftretenden Veränderungen durch PID verursacht werden [7, 11, 76, 77]. Dies konnte beispielsweise für einige *immediate early* Gene (*JunB*, *c-Jun*, *c-Fos*), *BDNF*, *Cox2* und Hitzeschockproteine (*hsp27*, *hsp32*) bestätigt werden [11, 21, 57, 63, 76, 78, 79]. Demgegenüber bleibt der Zusammenhang mit SD für andere nach fokaler Ischämie beschriebene Genexpressionsänderungen (z.B. *NGFI-B*, *MIP-1 α* , *Stat3*, *synaptophysin*) im *remote* Kortex bis heute offen. Eine Zusammenfassung der Ereignisse, die nach fokalen Ischämien auf entfernte, nicht-ischämische Kortexgebiete wirken (z.B. Ödembildung, Deafferentierung, Exzitotoxizität, SD), geben verschiedene Übersichtsarbeiten [80, 81].

SD und Ischämietoleranz

Im Gegensatz zu den unmittelbar schädigenden Effekten der SD-ähnlichen PID nach experimentell induzierten Infarkten, können SD auch zu einer Toleranzentwicklung gegenüber einer nachfolgend auftretenden Ischämie führen. Zwischen der sog. Präkonditionierung des normoxischen Gehirns mit SD und der Ischämieinduktion muss jedoch mindestens ein Tag liegen. Der protektive Effekt konnte sowohl bei globalen [82] als auch bei fokalen [83-87] Ischämien beobachtet werden. Durch die Präkonditionierung mit SD wurde das Ausmaß des Neuronensterbens als auch das Infarktvolumen deutlich reduziert.

Bisher ist nicht geklärt, welche molekularen Mechanismen der Toleranzinduktion durch SD zugrunde liegen. Als Kandidaten kommen unter anderem Transkriptionsfaktoren und *immediate early* Gene, Hitzeschockproteine, antioxidative Proteine oder neurotrophe Faktoren in Frage [88]. Yanamoto et al. zeigten, dass der durch SD verursachte protektive Effekt gegenüber einer mehrere Tage später induzierten Ischämie durch *knock out* eines BDNF-Allels verhindert wird [89]. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Toleranzinduktion nicht auf einzelnen molekularen Veränderungen sondern auf einem Zusammenspiel mehrerer Faktoren beruht.

Hinweise auf SD im menschlichen Gehirn – Relevanz für Migräne, Schädel-Hirn-Trauma und Schlaganfall

Bis heute wird die Bedeutung kortikaler SD für die Pathogenese von neurologischen Erkrankungen des Menschen kontrovers diskutiert. Der Nachweis im menschlichen Gehirn blieb bis vor kurzem

überaus schwierig, da man primär auf nicht-invasive Methoden angewiesen war. Erste Hinweise auf ein SD-ähnliches Phänomen beim Menschen gaben die Beschreibungen der während eines seiner Migräneanfälle auftretenden Auraereignisse von Lashley [90]. Leao and Morrision [13] waren die ersten, die SD als Ursache des wandernden Flimmerskotoms der klassischen Migräne vermuteten. Diese Idee wurde 1958 von Milner wieder aufgegriffen [91]. Er schloss aufgrund von Übereinstimmungen zwischen Ausbreitungsgeschwindigkeit von SD im Tiermodell und der von Lashley (1941) im Selbstversuch ermittelten Geschwindigkeit des wandernden Flimmerskotoms auf eine Korrelation zwischen beiden Phänomenen. Spätere Beobachtungen stützten diese Hypothese: Beispielsweise wiesen die im Zusammenhang mit der Migräneaura auftretenden neurologischen Dysfunktionen auf Phasen erhöhter (Szintillationen, Paraesthesie) und verminderter (negative Skotome, Anaesthesie) neuronaler Aktivität hin [92]. Beide Phänomene breiten sich hauptsächlich in den oberen Korterschichten aus [20], größere anatomische (z.B. Zentralsulcus) oder pathologische Hindernisse (z.B. Glianarben) stellen Barrieren dar [20, 93, 94]. Als weiteres Indiz galt, dass die Migräne-Aura meist im primären visuellen Kortex V1 (Area 17), einer Region mit sehr großer Neuronendichte, startet. Konsistent lassen sich SD besser in Arealen mit hohem Neuron-Glia Verhältnis auslösen [20]. Mit dem Aufkommen bildgebender Verfahren konnten weitere übereinstimmende Charakteristika der Migräne-Aura und der experimentellen SD identifiziert werden. In den 80-er Jahren fand man mit Hilfe der ^{133}Xe -Methode heraus, dass die klassische Migräneattacke von einer langanhaltenden Reduktion des kortikalen Blutflusses („*spreading hypoperfusion*“) begleitet wird [52, 95-97]. Funktionelle MRT-BOLD-Untersuchungen (*blood oxygenation level dependent* Magnetresonanztomographie) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Während einer visuellen Migräne-Aura wurden sich über den okzipitalen Kortex ausbreitende Signalveränderungen beobachtet, die eine Welle neuronaler Erregung, gefolgt von verminderter neuronaler Aktivität, repräsentierten. Diese wanderten parallel zur Ausbreitung der Migräne-Aura im Gesichtsfeld des Patienten mit einer Geschwindigkeit von 3-6 mm/min über den Kortex [98, 99]. Die Magnetenzephalographie erbrachte den ersten elektrophysiologischen Nachweis SD-ähnlicher Phänomene beim Menschen *in vivo*. Bowyer *et al.* wiesen während des Auftretens von spontanen oder visuell evozierten Auren langsame DC-Potentialänderungen nach, die sich wellenförmig über den Kortex ausbreiteten und mit einer gesteigerten neuronalen Aktivität gekoppelt waren [100].

Der direkte Nachweis, dass SD überhaupt in der grauen Substanz des menschlichen Gehirns ausgelöst werden können, gelang bereits vor etwa 30 Jahren [101]. Die Autoren mikroinjizierten KCl in

den Hippocampus oder den Nucleus caudatus von Epilepsiepatienten und lösten dadurch SD aus. Eine Reihe weiterer Hinweise ergab sich aus *in vitro* Studien an operativ entferntem Kortexgewebe von Epilepsiepatienten. Gorji *et al.* waren in der Lage, in neokortikalen Schnitten durch KCl-Injektion die für SD charakteristischen wandernden Änderungen des DC-Potentials auszulösen [102]. Diese bewegten sich mit der typischen Geschwindigkeit fort und waren durch den NMDA-Rezeptorantagonisten APV (2-amino-5-Phosphonovalerat) blockierbar. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits vorher von Avoli *et al.* gemacht [103].

Es blieb jedoch weiterhin spekulativ, ob SD im Kontext von traumatischen Hirnverletzungen oder des Schlaganfalls beim Menschen auftreten. Mayevski beobachtete 1996 als erster spontan auftretende repetitive SD-ähnliche Ereignisse bei einem von 14 Schädel-Hirn-Trauma-Patienten [104]. Diese zeichneten sich durch die für SD typischen Änderungen des ECoG, von $[K^+]_e$, des zerebralen Blutflusses und -volumens aus. Aufgrund technischer Einschränkungen blieb jedoch ungeklärt, ob sich das Phänomen ausbreitet oder nicht. Sechs Jahre später führten Strong *et al.* eine klinische Studie an Patienten mit traumatischen Kopfverletzungen durch [19]. Hier wurde das ECoG direkt durch Elektrodenstreifen vom periläsionellen Kortex abgeleitet. Bei 5 Patienten wurden episodische ECoG-Amplitudenänderungen detektiert, die mit einer Geschwindigkeit von 0.6 - 5 mm/min über den Kortex propagierten (n = 29). In der in diesem Jahr veröffentlichten Folgestudie wurden erstmals überzeugend repetitive Perinfarktdepolarisationen in Patienten mit Subarachnoidalblutungen nachgewiesen [105]. Es bleibt abzuwarten, ob sich diese Befunde auch nach primär ischämischen Infarkten (etwa 80-85 % aller Schlaganfälle) reproduzieren lassen.

Neurogenese im adulten Gehirn

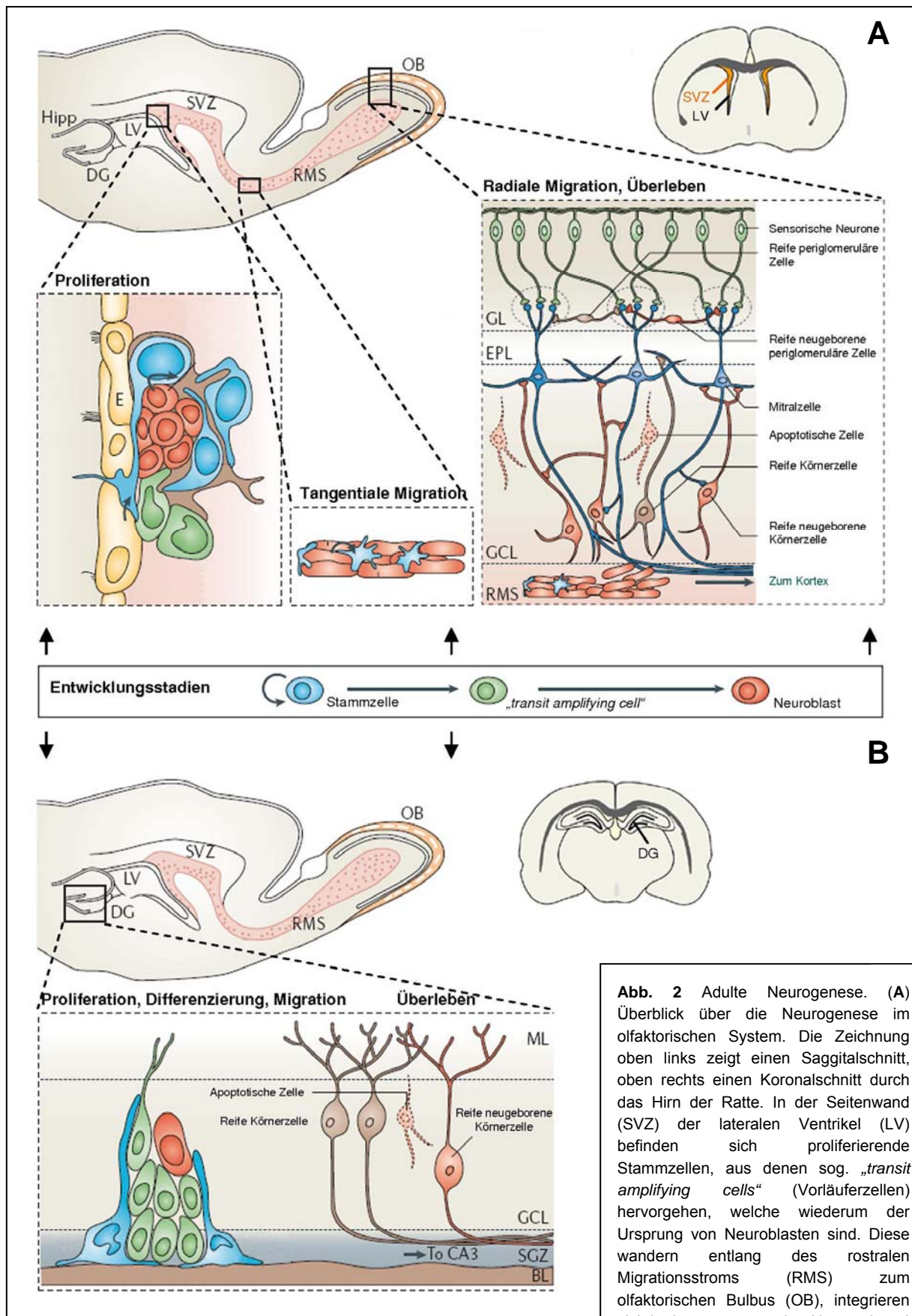
Während der Ontogenese eines Organismus von der befruchteten Eizelle zum erwachsenen Lebewesen werden alle Gewebe aus spezifischen, proliferierenden Vorläuferzellen gebildet. Im Embryo entwickeln sich nach und nach Organanlagen, aus denen Organe entstehen, deren Zellen sich weiter zu Geweben spezialisieren. Im Zuge dessen erfahren die Zellen eine immer stärkere Einengung ihrer Entwicklungsmöglichkeiten: Am Beginn steht die *totipotente* Zygote (Totipotenz = Fähigkeit, einen kompletten lebensfähigen Organismus hervorzubringen), aus der *pluripotente* Stammzellen (Pluripotenz = Fähigkeit einer Zelle, nahezu jeden Zelltyp eines Organismus hervorzubringen, z.B. embryonale Stammzellen), multipotente (fähig, verschiedene Zelltypen zu

bilden) und unipotente Vorläuferzellen (können Zellen desselben Zelltyps bilden) und letztendlich terminal differenzierte, i.d.R. teilungsunfähige Zellen, hervorgehen. Dabei behalten viele Organismen ein gewisses Potential, verloren gegangene Zellen zu regenerieren. Hierfür sind adulte Stammzellen verantwortlich, die sich ein Leben lang erneuern und dadurch Kopien ihrer selbst und spezialisierte Zellen des jeweiligen Organs hervorbringen können. Adulte Stammzellen persistieren in fast allen Organen und Geweben von Vertebraten, wie dem Knochenmark, der Epidermis, dem Darm oder der Haut [106, 107].

Lange nahm man an, dass das zentrale Nervensystem eine relativ starre, unveränderliche Struktur ohne Fähigkeit zur Regeneration sei. Diese Vorstellung, die z.T. auf den spanischen Mediziner S. Ramón y Cajal zurückgeht, blieb dogmatisch über Jahrzehnte erhalten, so dass erste Arbeiten, die die Entstehung neuer Zellen im adulten Gehirn zeigten, zunächst wenig Anerkennung fanden [108-110]. Erst als Kaplan und Hinds 1977 [111] eindeutig nachweisen konnten, dass es sich bei den neu gebildeten Zellen im olfaktorischen Bulbus und Gyrus dentatus der adulten Ratte tatsächlich um Neurone handelt, fand das Konzept der Regenerationsfähigkeit des Gehirns langsam Beachtung. In den folgenden Jahren gelang der Nachweis adulter Neurogenese in einer Reihe von Vertebraten, so z.B. in Schildkröten und Vögeln [112], Nagetieren [113, 114], Primaten [115, 116] bis hin zum Menschen [117].

Es stellte sich heraus, dass im Gehirn von adulten Säugetieren hauptsächlich zwei Regionen kontinuierlicher Neurogenese existieren – die Subventrikulärzone der lateralen Ventrikel und die Subgranulärzone des Gyrus dentatus (Abb. 2). In beiden Regionen gibt es eine Population sich teilender Stamm- und Vorläuferzellen, deren Tochterzellen zu Neuronen oder Gliazellen differenzieren können. Allerdings überlebt nur ein Teil der neugeborenen Zellen, viele werden über apoptotische Mechanismen eliminiert [118].

Die in der adulten Subventrikulärzone gebildeten Vorläuferzellen wandern entlang des rostralen Migrationsstroms zum olfaktorischen Bulbus, wo sie hauptsächlich zu GABA-ergen Interneuronen ausdifferenzieren, in die Körnerzellschicht integriert werden [113, 119] und funktionelle synaptische Verbindungen ausbilden [120]. Hinweise darauf gaben Studien, die demonstrierten, dass sich die Neurogenese im olfaktorischen System von Nagetieren durch sensorische Deprivation hemmen lässt [121] und dass dieser Effekt umkehrbar ist, wenn die Geruchsdeprivation aufgehoben wird [122]. Außerdem scheinen diese Zellen eine Rolle für die Ausprägung mütterlicher Brutpflege zu spielen – Schwangerschaft führt bei Ratten zur Steigerung der Neurogenese in der subventrikulären Zone [123].



Im Hippocampus werden neue Zellen an der Grenze zwischen Hilus und Körnerzellschicht gebildet (subgranuläre Zone). Die neuen Zellen verteilen sich entlang der Subgranulärzone, von dort wandern die Neuroblasten entlang der Fortsätze existierender Neurone und Radialglia-artiger Zellen in die Körnerzellschicht ein [124]. Hier differenzieren sie zu Neuronen, die morphologisch und immunzytochemisch nicht von Körnerzellen zu unterscheiden sind. Diese werden vollständig ins hippocampale Netzwerk integriert: sie entsenden Axone in die CA3-Region, bilden Synapsen aus und nehmen die elektrophysiologischen Eigenschaften adulter Körnerzellen an [125, 126]. Die physiologische Funktion der neu gebildeten Zellen im Gyrus dentatus ist bis heute nicht zufriedenstellend aufgeklärt, eine Reihe von Arbeiten sprechen jedoch dafür, dass sie an Lernvorgängen und der Gedächtnisbildung beteiligt sind [127]. Beispielsweise konnten van Praag *et al.* zeigen, dass eine Steigerung der adulten Neurogenese mit gesteigerter Langzeitpotenzierung (LTP) einhergeht. Versuche, die hippocampale Neurogenese durch Bestrahlung oder Zytostatika auszuschalten, resultierten in einer gestörten Leistung in einigen Hippocampus-abhängigen Lernaufgaben [128-131]. Vermutlich ist eine gestörte hippocampale Neurogenese auch für die Ausbildung depressiven Verhaltens mitverantwortlich. Diese Hypothese wird gestützt durch die Beobachtung, dass der Hippocampus depressiver Patienten stark atrophiert ist [132] und dass eine antidepressive Behandlung im Tierexperiment zu einer Erhöhung der hippocampalen Neurogenese führt [133, 134].

Die proliferative Aktivität in den neurogenen Zonen ist durch diverse physiologische und pathophysiologische Einflüsse modulierbar. Zu den physiologischen Aktivatoren gehören z.B. eine komplexe Umgebung, physische Aktivität oder Lernaufgaben [135-138]. Außerdem hängt die Neurogenese stark vom Hormonstatus des Tieres ab. Beispielsweise wurde gezeigt, dass eine Östrogenbehandlung die Proliferation hippocampaler Vorläuferzellen steigert [139], während die stressbedingte Freisetzung von Glukokortikoiden zu einer Hemmung hippocampaler Neurogenese führte [140]. Weiterhin kommt es infolge epileptischer Anfälle [141, 142], globaler oder fokaler ischämischer Infarkte [143, 144] oder einer Elektrokrampftherapie [133, 145] zu einer massiven Induktion von Neurogenese im Hippocampus und/oder der Subventrikulärzone.

FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Spreading depressions (SD) treten im Kontext verschiedener neurologischer Erkrankungen auf, darunter auch dem ischämischen Schlaganfall und der Migräne. Nach wie vor ist nicht geklärt, welchen Teil sie zur Pathophysiologie dieser Erkrankungen beitragen. Hierzu ist es notwendig, zunächst die Konsequenzen, die sich aus den SD allein ergeben, besser zu verstehen. Dazu sollte diese Arbeit einen Beitrag leisten.

Zwar wurde bereits in den 90-er Jahren mit der Expressionsanalyse einzelner Gene und Proteine nach SD begonnen, allerdings existiert bis heute keine Studie, die das Muster und die zeitliche Dynamik der molekularen Veränderungen nach SD beschreibt. Daher war das erste Ziel der vorliegenden Arbeit, einen umfassenden chronologischen Einblick in die durch SD verursachten molekularen Veränderungen zu gewinnen. Dazu wurden SD *in vivo* durch Applikation hyperosmolarer KCl-Lösung auf den Rattenkortex induziert und deren Auswirkung auf die Genexpression nach unterschiedlichen Überlebenszeiten mit Hilfe von Affymetrix Microarrays analysiert. Hilfsmittel zur Datenvalidierung waren quantitative PCR und die Immunhistochemie ausgewählter Proteine.

Weiterhin bestand Grund zu der Annahme, dass SD bzw. Periinfarktdepolarisationen (PID) an der nach fokalen Ischämien beobachteten Steigerung der Neurogenese beteiligt sein könnten. Während eine aktuelle Studie zeigte, dass SD die Zellproliferation in der subventrikulären Zone induzieren [146], ist bis heute nicht bekannt, ob sie auch in die Regulation hippocampaler Neurogenese eingreifen. Diesem Thema widmete sich der zweite Teil dieser Arbeit. Hierzu wurden Zellproliferation und -differenzierung, sowie die Apoptose im Gyrus dentatus von SD-Ratten mittels immunhistologischer Methoden analysiert. In diesem Kontext ergab sich die dritte Fragestellung: Falls SD die hippocampale Neurogenese beeinflussen, üben sie dann auch einen Langzeiteffekt auf hippocampale Funktionen aus? Zur Beantwortung dieser Frage wurden SD-Ratten in einem hippocampus-abhängigen Lernparadigma – dem Morris Water Maze – getestet.

Inzwischen weiß man sehr gut, welche Prozesse nach fokalen Ischämien auf das umliegende Gewebe einwirken, allerdings ist nicht hinreichend geklärt, welche funktionellen Veränderungen auf diese Prozesse im Einzelnen zurückzuführen sind. Die vorliegende Studie kann einen Beitrag dazu leisten, den Anteil, welchen SD zur Pathophysiologie des Schlaganfalls und anderer neurologischer Erkrankungen beitragen, zu bestimmen. Weiterhin kann die Entschlüsselung der molekularen Konsequenzen von SD potentiell neuroprotektive Gene identifizieren.

MATERIAL UND METHODEN

Versuchstiere

Alle Versuche wurden an männlichen, adulten Wistar-Ratten aus der Zucht des IVTK Jena durchgeführt (ca. 280-320 g). Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen mit *ad libitum* Zugang zu Futter und Wasser und einem 12 h Tag/Nacht-Rhythmus gehalten.

Alle Tierexperimente wurden durch das Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Dezernat Tierschutz, geprüft und entsprechend den Vorschriften des Tierschutzgesetzes durchgeführt (TVA 02-09/04).

Projekt 1: Genexpressionsstudie

Induktion der Spreading Depressions (SD) und elektrophysiologische Ableitungen

Zur Induktion der SD wurden die Tiere ($n = 64$) mit 2.5 % Isofluran in einem 1:2 O₂/N₂O-Gemisch (30 l/60 l) anästhesiert und stereotaktisch im Bereich des Ohres fixiert. Die Körpertemperatur wurde mit einem elektronischen Rektalthermometer überwacht und mit Hilfe einer rückgekoppelten Heizwanne auf $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ gehalten. Nachdem die Kalotte freigelegt wurde, wurden zwei Trepanationen von 1.8 mm Durchmesser über der linken Hemisphäre (2 mm lateral, Bregma +2 mm; 2 mm lateral, Bregma -6.8 mm) angelegt, die Dura mater blieb dabei intakt. Zur Ableitung des Gleichstrom (DC)-Potentials und des Elektrokortikogramms (ECoG) wurden Borosilikatgaselektroden (2-4 M Ω) hergestellt und mit künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF: 120 NaCl, 2 CaCl₂, 5 KCl, 1.8 MgCl₂, 10 HEPES, 1.25 NaH₂PO₄ und 10 Glucose; in mM; pH 7.4) gefüllt. Anschließend wurde ein chlorierter Silberdraht (Ag/AgCl) eingebracht, der mit einem DC- und EEG-Verstärker verschaltet war. Die Elektrode wurde unter mikroskopischer Sichtkontrolle vorsichtig auf die Dura aufgesetzt. Als Bezugspotential diente das über einen Ag/AgCl-Draht abgegriffene subkutane Nackenpotential. Die Signale wurden 100-fach verstärkt und nach analog-digitaler Wandlung (CED 1401, Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, England) auf einem PC mittels Spike2 Software aufgezeichnet und gespeichert. Nachdem alle potentiell schmerzhaften Eingriffe beendet waren, wurde die Narkose sukzessive auf 1.5 % Isofluran herabgesetzt, diese Zeit diente auch zur Stabilisierung der Elektrodenpotentiale. Zur Induktion der SD wurden Tupfer, die in 3 M KCl getränkt waren, auf die Dura in der posterioren Trepanation gelegt und ca. alle 15 min erneuert. Nachdem 7 ± 2 SD registriert

waren (in einem Zeitraum von 100-120 min), wurde der Tupfer entfernt, die Trepanation mehrmals mit aCSF gespült und mit Knochenwachs verschlossen. Tiere mit weniger als 5 SD wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Den scheinoperierten Kontrollen wurde für 110 min equimolare (3 M) NaCl-Lösung auf die posteriore Dura appliziert. Beispiele der DC-Potentiale KCl- und NaCl-behandelter Ratten sind in Abb. 3 gezeigt.

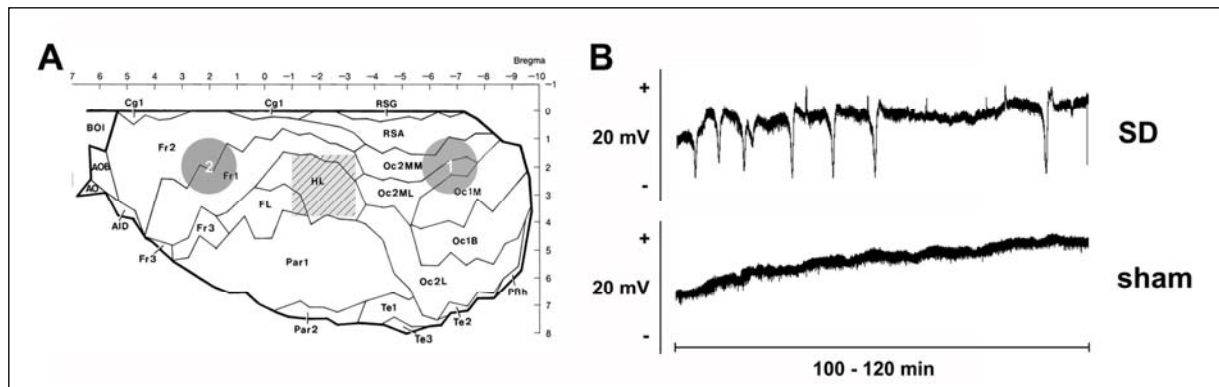


Abb. 3 Schema der Induktion und Registrierung von SD (A). 3 M KCl/NaCl wurde epidural über dem okzipitalen Kortex appliziert (1) während die DC-Potentiale vom frontalen Kortex abgegriffen wurden (2). Das Gewebe wurde im Bereich des ipsilateralen HL-Kortex zwischen Position 1 und 2 entnommen (schraffiert), um sicherzugehen, dass die registrierten SD auch das entnommene Gewebe betrafen. Modifiziert nach Zilles [147]. (B) Beispiele zweistündiger DC-Ableitungen nach KCl bzw. NaCl-Applikation. Typische SD hatten eine Amplitude von ca. 4-10 mV.

RNA Isolierung

Die Tiere ($n = 64$) wurden 3 h, 1 d, 7 d oder 30 d nach der Applikation von KCl bzw. NaCl unter Enflurannarkose dekapitiert ($n = 16$ zu jedem Zeitpunkt: 10 pro KCl- und 6 pro NaCl-Gruppe). Zur Präparation des Hinterpfotenareals (HL) wurde das Gehirn zunächst aus dem Schädel herauspräpariert und dabei ständig mit 4°C aCSF gekühlt. Anschließend wurden 2 koronale Schnitte bei Bregma -1 und -3.3 geführt. Aus dem so gewonnenen 2.3 mm dicken Hirnschnitt wurden ipsi- und kontralateraler HL entnommen. Die Schnittführung erfolgte dabei jeweils 1.6 und 3.8 mm lateral zur Mittellinie. Die Gewebestückchen wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Isolation der gesamt-RNA erfolgte nach einem kombinierten TRIZOL- und RNeasy-Protokoll. Das gefrorene Gewebe wurde mit einem Micra D-1 (ART, Müllheim, Deutschland) in 900 µl eiskaltem TRIZOL (Invitrogen, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) homogenisiert. Das Homogenat wurde 5 min bei RT inkubiert und in ein 1.5 ml Phase Lock Gefäß überführt (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Nach Zugabe von 180 µl Chloroform wurden die Proben geschüttelt und für

weitere 2 min bei RT inkubiert. Dann erfolgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 15700 x g und 12°C. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 280 µl Ethanol versetzt, auf eine RNeasy Mini Säule überführt (Qiagen, Hilden, Deutschland) und bei 7500 x g für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule entsprechend den Angaben des RNeasy Protokolls gewaschen und die RNA mit 30 µl DEPC-behandeltem Wasser eluiert (2 min Inkubation gefolgt von 2 min Zentrifugation bei 15700 x g). Die gereinigte RNA wurde spektrometrisch quantifiziert (ND-1000; Nanodrop, Wilmington, DE, USA). Die Integrität der Proben wurde in mehreren Schritten überprüft: (i) auf einem denaturierenden Agarosegel, (ii) spektrometrisch am ND-1000 und (iii) mit einem RNA 6000 LabChip Kit (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), letzteres jedoch nur für die gepoolten RNAs. Dementsprechend mussten folgende Kriterien erfüllt sein: (i) diskrete 28S und 18S RNA Banden, keine hochmolekularen Banden (DNA-Kontamination), keine niedermolekularen Banden (degradierte RNA); (ii) A_{260}/A_{280} -Ratios von 1.9 bis 2 (Ausschluss von Kontamination der Proben durch Proteine oder DNA) und (iii) keine irregulären niedermolekularen Peaks und 28S/18S RNA-Ratios > 1.8 (Ausschluss von RNA Degradation).

Genexpressionsanalyse mittels Affymetrix Microarrays

Zum Studium der SD-vermittelten Genexpression mit Oligonucleotidarrays wurden die ipsilateralen HL-RNAs jeder Gruppe gepoolt ($n = 10$ pro SD Gruppe und $n = 6$ pro Kontrollgruppe zu jedem Zeitpunkt), so dass der Pool 10 µg RNA enthielt und der Anteil der Einzelproben äquivalent war. Die gepoolten RNAs wurden entsprechend des von Affymetrix vorgegebenen Protokolls in biotinylierte Antisense-cRNA umgeschrieben. Dazu wurden die in der totalen RNA enthaltenen Proteinkodierenden mRNAs mit Hilfe von T7-Oligo(dT) Primern und des Enzyms Reverse Transkriptase (Superscript II, Life Technologies; GensetSA) zunächst in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. In einem zweiten Schritt wurde die RNA-Matrize durch RNase H entfernt und der komplementäre cDNA-Strang durch DNA-Polymerase I und DNA-Ligase synthetisiert. Die doppelsträngige cDNA wurde über eine Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und auf einem 1.5 %-igem Agarosegel analysiert. Anschließend erfolgte ein *in vitro* Transkriptionsschritt mit einer T7-Polymerase in Anwesenheit Biotinmarkierter Ribonukleotide (ENZO BioArray Transcript Labeling Kit; Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), welcher gleichzeitig zu einer linearen Amplifikation des Materials führte. Die resultierende cRNA wurde nach RNeasy-Vorschrift gereinigt und spektrometrisch quantifiziert. Die cRNA wurde NH_4Ac -präzipitiert und fragmentiert. Nach der Hybridisierung der cRNA-Fragmente auf Affymetrix Rat

Expression Set 230 A (RAE230A) Chips wurden diese gewaschen, gegengefärbt und auf einem Affymetrix GeneChipScanner 2500 gescannt.

Der RAE230A Chip erlaubt die simultane Analyse von ca. 14000 UniGene Clustern, die im Folgenden als Gene oder Transkripte bezeichnet werden sollen, einschließlich 4700 Full-Length Sequenzen. Jedes Gen auf diesem Chip wird durch ein oder mehrere von 15866 sog. Oligonucleotid-Probesets repräsentiert, deren Sequenz von den 600 proximalen Basen am 3'-Ende jedes Transkripts abgeleitet ist. Ein Probeset besteht aus 11 verschiedenen, über den Chip verteilten sog. *probe pairs*, wovon wiederum jedes aus 2 sog. *features* oder Probenzellen besteht: einer gen-spezifischen *perfect match*- (PM) und einer *mismatch*- (MM) Probenzelle (Abb. 4). Letztere enthält Oligomere mit einem homomeren Basenaustausch in der Mitte der Sequenz, sie dient der Detektion und Verrechnung von unspezifischen Interaktionen (z.B. Kreuz- oder unspezifische Hybridisierungen). Eine einzelne Probenzelle ist 18x18 µm groß und enthält mehrere Millionen ein- und derselben Oligonucleotidsonde (25-mer).

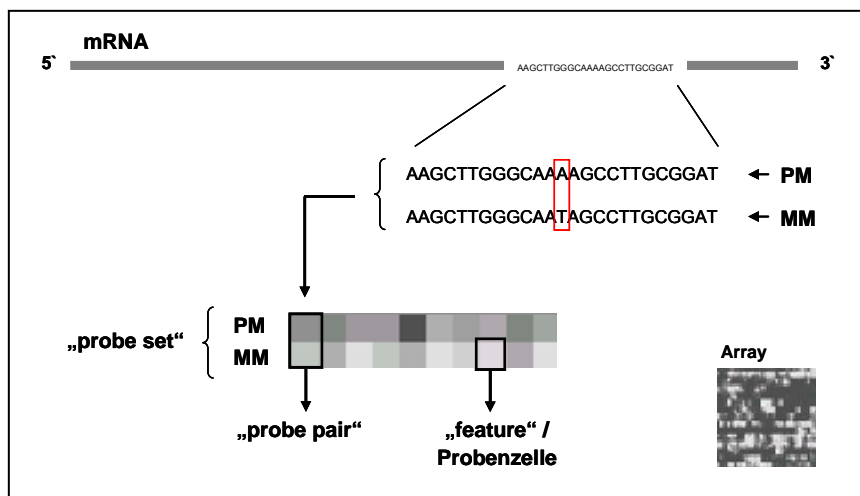


Abb. 4 Schema zum Aufbau eines Probesets auf dem Affymetrix RAE230A Chip. Der Array enthält mehrere Hunderttausend Probenzellen, welche jeweils Gen-spezifische Oligonucleotide enthalten. Jedes Gen ist durch ein spezifisches Probeset repräsentiert. Ein Probeset setzt sich aus 11 verschiedenen *probe pairs* zusammen, die jeweils aus einer *perfect match*- (PM) und einer *mismatch*- (MM) Probenzelle bestehen. Die *probe pairs* sind über den gesamten Array verteilt.

Direkt nach dem Scannen der Chips wurde eine Absolutanalyse durchgeführt. Die verwendete Software war die Microarray Suite 5.0 (MAS 5.0) von Affymetrix. Zunächst musste eine Normalisierung der Chipdaten vorgenommen werden, um eine direkte Vergleichbarkeit der Arrays zu gewährleisten. Dies kann zum einen anhand von speziellen *probe sets*, z.B. einem Set von Housekeeping Genen oder Hybridisierungskontrollen, oder aber wie in dieser Studie, durch globales Scaling erfolgen. Beim globalen Scaling wird von der Annahme ausgegangen, dass die

Gesamtintensitäten verschiedener Chips vergleichbar sind, da auf jeden Array die gleiche RNA-Menge gebracht wurde und normalerweise nur ein kleiner Teil der Transkripte reguliert ist, welcher in der Gesamtheit nicht ins Gewicht fällt. Hier wurde die Gesamtfluoreszenzintensität eines jeden Chips auf einen Wert von 150 eingestellt. Die resultierenden Scaling Faktoren aller Chips waren vergleichbar (0.194 ± 0.047). Anschließend erfolgte eine Statistik-basierte Kalkulation der absoluten Expression der Transkripte (*absolute call*), wodurch diese entsprechend der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität als exprimiert (*present* [P]), nicht exprimiert (*absent* [A]) oder gering exprimiert (*marginal* [M]) eingeordnet wurden. Anhand dieser Daten wurde eine paarweise MAS 5.0 basierte Vergleichsanalyse zwischen den skalierten SD- und Kontrollarrays jedes Zeitpunktes durchgeführt. Hieraus resultierten die für die weiteren Analysen verwendeten *change p-values* (CPV; Statistik-basierter Wert zur Beurteilung der differentiellen Expression) und *signal log ratios* (SLR), welche den binären Logarithmus des Faktors, um den sich die Expression eines Genes relativ zur Kontrolle unterscheidet, darstellt.

Erzeugung der Kandidatengen-Listen

Die Auswertung wurde MAS 5.0 und Excel-basiert vorgenommen. SD- und Kontrollchip eines Zeitpunktes wurden paarweise verglichen. Alle Probesets, welche zur Qualitätskontrolle dienten und solche mit A- oder M-Call auf beiden Chips eines Zeitpunktes, wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Die Parameter für eine signifikant differentielle Expression waren zum einen *change p-values* von < 0.0045 oder > 0.9955 plus eine mindestens 2-fache Hoch- bzw. Herunterregulation (SLR mind. $1/-1$) der entsprechenden Gene. Ausgeschlossen wurden außerdem solche Gene, deren *change-call* einzig durch eine Regulation innerhalb der Kontrollgruppen über die Zeit zustande kam. Die Kriterien hierfür waren eine ≥ 2 -fache Regulation zwischen den Kontroll-Gruppen beim Vergleich konsekutiver Zeitpunkte während sich die Genexpression zwischen den entsprechenden SD-Gruppen nicht änderte.

Um einen Überblick über den zeitlichen Verlauf der Genexpression nach SD zu gewinnen, wurden die verbleibenden 353 Gene hierarchisch geclustert (Genesis 1.3.0 Software; [148]). Hierzu wurde ein multivariates Testverfahren angewendet, als Linkage-Methode diente das *average linkage* und *Euclidian Distance* als Distanzmaß.

Quantitative RT-PCR

Als unabhängige Methoden zur Validierung der Microarray-Daten fanden Immunhistochemie und quantitative RT-PCR (qRT-PCR) Anwendung. Letztere soll im Folgenden näher beschrieben werden.

Jedes der ausgewählten Gene wurde in mindestens 2 unabhängigen Experimenten an den gepoolten mRNAs und einmal an den einzelnen Proben, welche zur Generierung der Pools verwendet wurden, getestet. Die Gesamt-RNA (50 ng/μl) wurde in einem Volumen von 20 μl durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (iScript cDNA Synthesis Kit, Biorad, Hercules, CA, USA). Diese wurde 5-fach mit H₂O_{DEPC} verdünnt und bei -20°C gelagert. Die qRT-PCR wurde an ca. 15 ng cDNA pro 15 μl Ansatz durchgeführt. Hierfür wurden der iQ SYBR Green Supermix (Biorad) und Gen-spezifische Primer verwendet.

Das Design der Primer erfolgte mit Hilfe von PRIMER3 (Whitehead Institute for Biomedical Research), die Spezifität und Dimer- bzw. Sekundärstrukturbildung der Primer wurde mittels NCBI-BLAST und Oligoanalyzer (www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx) überprüft. Wenn möglich wurden Intron-Exon-überspannende Primer generiert. Für Primersequenzen, Konzentrationen, Annealing-Temperaturen (T_a) und Amplifikatlängen siehe Tabelle 1.

Tabelle 1

Transkript		Primersequenzen		Konz.	Länge	T _a
		fw	rev			
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TCCCTCAAGATTGTCAGCAA	AGATCCACAACGGATACATT	500 nM	308 bp	59°C
rpl32	ribosomal protein L32	CTGGTGAAGCCAAGATCGTC	GAACACAAAACAGGCACACAAGC	200 nM	416 bp	59°C
HPRT	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	TGGACAGGACTGAAAGACTTGC	ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA	500 nM	118 bp	56°C
b2M	β2-microglobulin	GGTGACCGTGATCTTCTGGTG	CTCCTTCAGAGTGACGTGTTAAC	500 nM	316 bp	59°C
TTR	transthyretin	CTCGCTGGACTGATATTTGCGTC	GAACCTTCATCTGTGGTGAGCC	300 nM	222 bp	62°C
trkB	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	CTGGACCACGCCAACTGACATC	GCCAAACTTGAATGTCTCGCC	500 nM	190 bp	63°C
ATP1b2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, β2 polypeptide	GACCCACTCACTATGGTTACAG	CAAACTTGTCCTCGCTCATC	500 nM	340 bp	62.5°C
TIMP1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	GACCACCTTATACGAGCATTATG	CAGCACTATAGGCTTTACGAAGG	500 nM	275 bp	61°C
CD74	CD74 antigen	GAGCAAGAAGTCCCTGGAGGAG	CTATCCCTGTGAGTGGGCTAG	200 nM	393 bp	63°C
PRPS2	phosphoribosylpyrophosphatesynthase II	GCAAGATTGCATCCTCATCCAGG	AACCCCTTTGGCTCCTCCAGCAT	500 nM	305 bp	61.5°C
EGR1	early Growth Response 1	GGCAATAACAGCAGCAGCAGCA	GGCGCTGAGGATGAAGAGTTG	200 nM	347 bp	63°C
DEXRAS1	dexas1	CTCATCCAAAGTGGGCAAGACG	CGGCACGTCCACATTCTCTTTG	500 nM	325 bp	63°C
CML3	camello-like 3	CTTGTTTCCCTGTGGCTCCTTG	GAAGCCCTGCATCTCTGAAAC	200 nM	300 bp	62.5°C
MCP-1	chemokine ligand 2	CTGGGCCTGTTGTTACAGTTG	AGTTCTCCAGCCGACTATTGG	400 nM	130 bp	62°C
Cox2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	GTTGCGATTCTTTGCCAGCAC	ACATCATCAGACCCGGCACCAG	300 nM	311 bp	60°C
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	CAAGTGCCCTTGAGGCTCCTC	AGTTGGCATTGCGAGTTCAG	200 nM	336 bp	61.5°C

Um die relative Expression der Gene und die Reaktionseffizienz bestimmen zu können, wurden in jedem PCR-Lauf externe Standards mitgeführt. Zur Herstellung dieser Standards wurden konventionelle 20 μl-PCR-Reaktionen in einem Blockcycler durchgeführt (Platinum PCR SuperMix,

Invitrogen), dazu fanden dieselben Primer Verwendung, wie später für die qRT-PCR. Die PCR-Produkte wurden auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden über Nacht bei 4°C in 200 µl H₂O_{GIBCO} (Invitrogen) inkubiert, anschließend wurden die Eluate als Template in einer weiteren PCR reamplifiziert: 120 µl Gelextrakt; 16 µl H₂O_{GIBCO}; je 25.1 µl 5 pmol/µl Primerlösung; 20 µl 2.5 mM dNTP (Invitex, Berlin, Deutschland); 7.9 µl 50 mM MgCl₂; 26.1 µl Platinum-Puffer; 2.61 µl BSA; 3.2 µl Platinum-Polymerase (alles Invitrogen). Die resultierende cDNA wurde mit dem Invitex PCRRapace Kit gereinigt, ihre Konzentration bestimmt und eine Stammlösung mit 10¹⁰ Molekülen hergestellt. Aus dieser wurden dann durch sukzessive Verdünnung die Eichreihen hergestellt.

Die Normalisierung von qRT-PCR Daten erfolgt im Allgemeinen relativ zu einem oder mehreren Housekeeping-Genen. Dies sind solche Gene, die meist relativ konstant und ubiquitär exprimiert werden. Die geläufigsten Housekeeping-Gene zur Normalisierung sind β-Aktin, GAPDH, Ubiquitin oder ribosomale Untereinheiten. Da eine Regulation von Housekeeping-Genen nicht ausgeschlossen werden kann, ist es ratsam, zunächst das Expressionslevel mehrerer dieser Gene zu vergleichen, um das/die mit der stabilsten Expression zu identifizieren. Im ersten Schritt wurden hierfür die Microarray Daten gesichtet und eine Gruppe von 4 potentiellen Kandidaten (*GAPDH*, *HPRT*, *rpL32* und *b2M*) ausgewählt. Anschließend wurden qRT-PCR für diese und andere Gene sowohl mit den Einzelproben als auch Pools durchgeführt. Nach Analyse der qRT-PCR Daten in GeNorm [149] wurden *GAPDH*, *HPRT* und *b2M* als beste Housekeeping-Gene für diesen experimentellen Ansatz identifiziert. Alle 3 Gene zeigten einen ähnlichen Expressionsverlauf in den verschiedenen Untersuchungsgruppen.

Um die cDNA auf Kontamination mit genomischer DNA (gDNA) zu untersuchen, wurde eine konventionelle *GAPDH* PCR mit Intron-übergreifenden Primern durchgeführt (30 s 99.9°C; 150 s 94°C; 40x [je 30 s 94°C, 59°C, 72°C]) und die PCR-Produkte auf einem 2%-igem Agarosegel analysiert. Bei Kontamination mit gDNA wäre ein zweites, 112 Basen längeres Produkt zu erwarten gewesen. Alle 116 analysierten cDNA zeigten nur ein Produkt mit einer Länge von 308 Basen, so dass gDNA-Kontamination ausgeschlossen werden konnte. Da *GAPDH* Pseudogene besitzt, wurde in analoger Weise eine *Egr1*-PCR mit den gepoolten Proben durchgeführt (T_a = 63°C). Hier würde eine Kontamination mit gDNA zur Amplifikation eines zusätzlichen 1019 Basen langen Produkts führen. Es wurde nur das kurze aus cDNA resultierende Produkt detektiert.

Auch die für jeden qRT-PCR-Lauf durchgeführte Schmelzkurvenanalyse diente der Identifizierung möglicher gDNA-Verunreinigungen, als auch der Verifizierung der Primerspezifität (iCycler-Software).

Weiterhin wurde in jedem qRT-PCR-Lauf eine *non-template* Kontrolle eingeschlossen, um mögliche Kontaminationen des Pipettieransatzes auszuschließen. Hier wurde statt cDNA das gleiche Volumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{GIBCO}}$ eingesetzt.

Die Auswertung der qRT-PCR Daten erfolgte nach der Methode von Pfaffl [4]. Vorteil dieses Modells ist, dass die Berechnung Effizienz-korrigiert erfolgt, im Gegensatz zu anderen Modellen, z.B. der *delta-delta-CT*-Methode, die von einer optimalen Effizienz (100%) der Reaktion ausgehen. Letzteres ist jedoch sehr selten der Fall, so dass sich geringste Schwankungen in den Effizienzen zwischen Referenz- und Zielgen massiv auf die berechneten Expressionsunterschiede auswirken. Im Modell nach Pfaffl wird eine Quantifizierung der Expression eines Zielgenes relativ zu einem oder mehreren Housekeeping-Genen berechnet. Im vorliegenden Fall wurde zunächst das Verhältnis der Expression der Zielgene in SD- vs. Kontrollproben relativ zur Expression der Housekeeping-Gene berechnet. In diese Berechnung fließen die o.g. qRT-PCR Effizienzen und der Ct-Wert (*threshold cycle*, = PCR-Zyklus, in dem die PCR-Kurve ein festgelegtes Fluoreszenzniveau erreicht) ein. Anschließend wurden die endgültigen Expressionsunterschiede (Ratios) durch Berechnung des geometrischen Mittels der einzelnen Ratios, die aus den Vergleichen mit *GAPDH*, *HPRT* und *b2M* resultierten, berechnet.

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta Ct_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{SD})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta Ct_{\text{Referenzgen}} (\text{Kontrolle} - \text{SD})}} \quad 1$$

Mathematisches Modell zur Berechnung der relativen Expressionsunterschiede (R) nach Pfaffl. E_{Zielgen} ist die qRT-PCR Effizienz des Zielgens; $E_{\text{Referenzgen}}$ ist die qRT-PCR Effizienz des Referenzgens; $\Delta Ct_{\text{Zielgen}}$ ist die Differenz der Ct von Kontrolle und SD des Zielgens; $\Delta Ct_{\text{Referenzgen}}$ ist die Ct-Differenz von Kontrolle und SD des Referenzgens.

Immunhistochemie (Peroxidase Technik) und Immunfluoreszenz

Nach der Entnahme des HL-Kortex wurden die verbleibenden Hirnteile in -25 bis -30°C kaltem Methylbutan eingefroren und bei -80°C gelagert. Das gefrorene Gewebe wurde direkt in eiskaltes 4%-iges PFA überführt und für 4 Tage bei 4°C fixiert. Nach Kryokonservierung (24 h 10%, dann 48 h 30% Succrose bei 4°C) wurden mit einem Gefriermikrotom (Microm, Walldorf, Deutschland) 40 µm dicke koronale Schnitte angefertigt und in Antifreeze-Lösung bei -17°C aufbewahrt.

Zur immunhistochemischen Darstellung von c-Fos, Stat3, hsp27 und Cox-2 wurden die Schnitte im free-floating-Verfahren prozessiert (je 3 Tiere pro Gruppe). Das Gewebe wurde 5 x 10 min in TBS

gewaschen, die Blockierung endogener Peroxidasen erfolgte durch 30-minütige Inkubation in 0.18% H_2O_2 . Es folgte ein Waschschriff in TBS/0.2% Triton. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen und zur Permeabilisierung des Gewebes wurden die Schnitte für 1 h bei RT in TBS plus inkubiert. Alle Antikörper wurden in TBS plus verdünnt. Die Inkubation in primärem Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C, anschließend wurde das Gewebe dreimal 15 min in TBS gewaschen und dann 1 h in sekundärem Antikörper inkubiert. Nachdem die Schnitte dreimal gewaschen wurden, erfolgte eine einstündige Inkubation mit Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vector Elite Standard Kit, Vector Laboratories) bei RT, danach noch ein Spülgang und schließlich die Anfärbung der immunmarkierten Zellen mit DAB-Lösung (0.5 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride in TBS/0.2% Triton, Sigma; und 0.009% H_2O_2) für 12 min. Die Hirnschnitte wurden gewaschen, auf gelatinierte Objektträger aufgezogen, getrocknet und mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

Zur Phänotypisierung wurden Mehrfachmarkierungen mit neuronalen (NeuN), astrozytären (GFAP), mikroglialen (OX-42) und oligodendroglialen (O4) Markern durchgeführt. Dazu wurden jeweils Schnitte des Zeitpunktes analysiert, zu dem zuvor in der Immunhistochemie die stärkste Expression detektiert wurde. Im Falle von c-Fos, Stat3 und hsp27 wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C in primärem Antikörper inkubiert, mehrmals in TBS gewaschen und für 4 h bei RT mit sekundärem Antikörper plus DAPI behandelt. Nach mehrmaligem Waschen in TBS wurden sie aufgezogen und in Mowiol eingedeckt. Für die Cox-2-Immunfluoreszenz musste ein modifiziertes Protokoll verwendet werden, da mehrere Primärantikörper aus derselben Spezies eingesetzt wurden. Die Markierung erfolgte schrittweise mit zwischengeschalteten Blockierungen freier Antikörperbindungsstellen: (a) Präinkubation der Schnitte für 1 h in TBS plus; (b) erste Primärantikörper (Cox-2 und GFAP) über Nacht bei 4°C; (c) 4 x 10 min waschen in TBS, 1 x TBS/0.2 % Triton; (d) 3-stündige Inkubation im ersten Sekundärantikörper bei RT; (e) 4 x 10 min waschen in TBS, 1 x TBS/0.2 % Triton; (f) 3 h 10% Mausnormalserum (Dianova) in TBS plus bei RT, um freie Antigen-Bindungsstellen des Sekundärantikörpers abzudecken; (g) 4 x 10 min waschen, 1 x TBS/0.2 % Triton; (h) über Nacht (4°C) Inkubation in unkonjugiertem Fab-Fragment Esel anti-Maus (1:20; Dianova), um alle freien Bindungsstellen (schwerer und leichter Ketten) abzusättigen; (i) 4 x 10 min waschen, 1 x TBS/0.2 % Triton; (j) Inkubation im zweiten Primärantikörper (NeuN oder O4 oder OX-42) 3 h bei RT; (k) 4 x 10 min waschen, 1 x TBS/0.2 % Triton; (l) Inkubation im zweiten Sekundärantikörper plus DAPI für 3 h

bei RT und (m) waschen und eindecken in Mowiol. Ergänzend wurden Einzelmarkierungen durchgeführt, um eine mögliche Kreuzmarkierung auszuschließen.

Tabelle 2 Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
<i>primäre Antikörper</i>		
Kaninchen anti-c-Fos	1:600	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Maus anti-Cox-2	1:400 / 1:100	BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA
Kaninchen anti-Stat3	1:500 / 1:100	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Ziege anti-hsp27	1:500 / 1:100	Santa Cruz Biotechnology
Maus anti-NeuN	1:500	Chemicon, Temecula, CA, USA
Maus anti-OX-42	1:100	Serotec Ltd, Oxford, UK
Maus anti-O4	1:50	Chemicon, Temecula, CA, USA
Meerschweinchen anti-GFAP	1:500	Advanced ImmunoChemical, Long Beach, CA, USA
<i>sekundäre Antikörper</i>		
Rhodamine-X Esel anti-Meerschweinchen	1:250	Dianova, Hamburg, Deutschland
Alexa-488 Esel anti-Kaninchen	1:250	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Alexa-488 Esel anti-Maus	1:250	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Cy5 Esel anti-Maus	1:250	Dianova, Hamburg, Deutschland
Biotin Pferd anti-Maus	1:500	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Biotin Esel anti-Kaninchen	1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland

Die Verdünnungen sind angegeben für Immunhistochemie und (wenn davon abweichend) Immunfluoreszenz.

Projekt 2: Neurogenesestudie

Induktion der Spreading Depressions (SD), MK-801-Injektion und elektrophysiologische Ableitungen

Die Experimente wurden an einer Gruppe von 32 Ratten durchgeführt. Die chirurgischen Eingriffe und elektrophysiologischen Ableitungen erfolgten in gleicher Weise wie für die Genexpressionsstudie beschrieben. Einziger Unterschied war die Position der hinteren Trepanation (3 mm lateral, Bregma -5 mm) zur Applikation der Salzlösungen (Abb. 5A).

Vier weitere Tiere erhielten 45 min vor der KCl-Applikation eine intraperitoneale Injektion des nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 (3 mg/kg KG in 0.9% NaCl; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland).

In einer Gruppe von 4 Ratten wurde zusätzlich zum kortikalen auch das hippocampale DC-Potential abgegriffen. Hierzu wurden die Trepanationen bei folgenden Koordinaten angelegt: 2 mm lateral, Bregma +2 mm zur Ableitung des kortikalen DC-Potentials; 2 mm lateral, Bregma -5.5 mm zur KCl-Applikation; und 1.5 mm lateral, Bregma -3.5 mm zur Ableitung des hippocampalen DC-Potentials (Abb. 5B). Nach Einritzen der Dura mater im Bereich der mittleren Trepanation mit einer Kanüle wurde

die Ableitelektrode mit einem NANOSTepper Type B (Scientific Precision Instruments, Oppenheim, Deutschland) in 0.5 μm Schritten bis zu einer Tiefe von 2.56 ± 0.1 mm in die CA1-Region des Hippocampus herabgefahren. Das hippocampale DC-Potential wurde parallel zum kortikalen für 3 Stunden (nachdem erstmals KCl auf den okzipitalen Kortex aufgebracht wurde) registriert, um ein eventuelles Auftreten von SD im Hippocampus auch nach Ende der 2-stündigen KCl-Applikation auszuschließen.

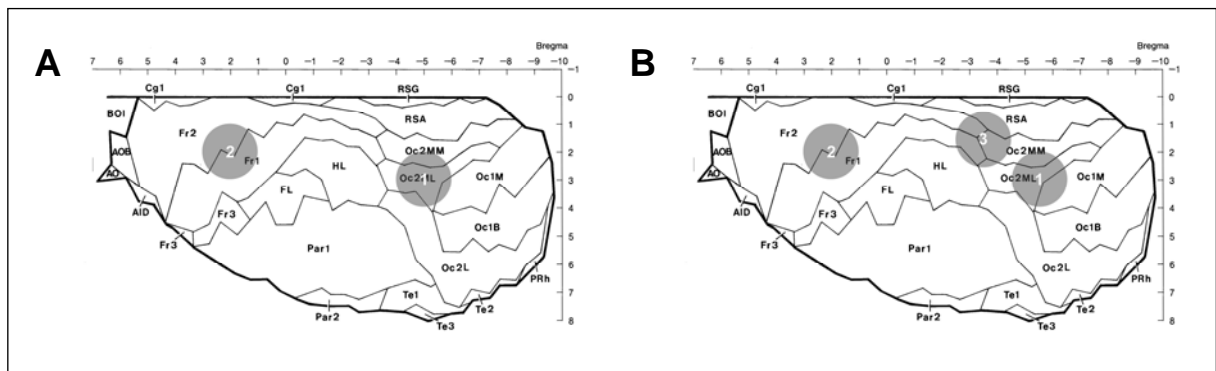


Abb. 5 Schematische Darstellung der Positionen zur Ableitung des kortikalen (2) und hippocampalen (3) DC-Potentials sowie der KCl- bzw. NaCl-Applikationsstelle (1). (A) und (B) unterscheiden sich durch eine Verschiebung der Salzapplikationsstelle um 0.5 mm nach caudal in (B), dies war erforderlich, um Platz für die hippocampale Ableitung zu schaffen und ein Übertreten der KCl-Lösung auf die mittlere Position zu verhindern.

Induktion der photothrombotischen Läsionen (PT)

Die Induktion der neokortikalen ischämischen Läsionen erfolgte nach einer von Watson *et al.* [150] entwickelten Methode, modifiziert nach Schiene *et al.* [151]. Die Tiere ($n = 18$) wurden initial für 3 min mit 2.5% Isofluran anästhesiert, anschließend wurde der Isoflurananteil auf 2% gesenkt. Die Rektaltemperatur wurde über eine Heizmatte auf $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ gehalten. Nach einem Hautschnitt im Leistenbereich wurde die linke *Vena femoralis* freigelegt und ein Polyethylenkatheder (Außendurchmesser 0.61 mm) eingeführt. Nach der Aspiration von Blut zur Kontrolle des korrekten Sitzes des Katheders wurde dieser fixiert und mit 0.9% NaCl freigespült. Nun wurde die Ratte stereotaktisch fixiert und die Kalotte durch einen medianen Hautschnitt freigelegt. Anschließend wurde ein Lichtleiter (\varnothing 1.4 mm) über Bregma -5 und 3 mm lateral platziert (siehe Position 1 in Abb. 5A; Abb. 6). Dieser war mit einer Kaltlichtquelle (KL 1500, Schott; Stufe 4.5, Streulicht) verbunden, welche zeitgleich mit der intravenösen Verabreichung des photosensitiven Farbstoffes Bengal Rosa (10 mg/ml; 4,5,6,7-Tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein disodium salt; Aldrich) eingeschaltet wurde.

Innerhalb von 30 s wurden 0.4 ml der Farbstofflösung appliziert, dabei war zwischen Katheder und Spritze ein 0.20 µm Membranfilter (Sartorius, Göttingen, Deutschland) positioniert. Nach einer 20-minütigen Belichtungsphase wurde der Katheder entfernt, die Wunden vernäht und die Narkose ausgeleitet. Die Kontrolltiere unterschieden sich nur durch fehlende Belichtung, die Eingriffe und deren Dauer waren analog denen der PT-Tiere.

Bengal Rosa ist ein photosensitiver Farbstoff welcher unter Lichteinwirkung freie Radikale freisetzt. Dies führt durch Schädigung des Gefäßendothels vermutlich zu einer Aggregation von Thrombozyten was wiederum einen thrombotischen Gefäßverschluss verursacht [152].

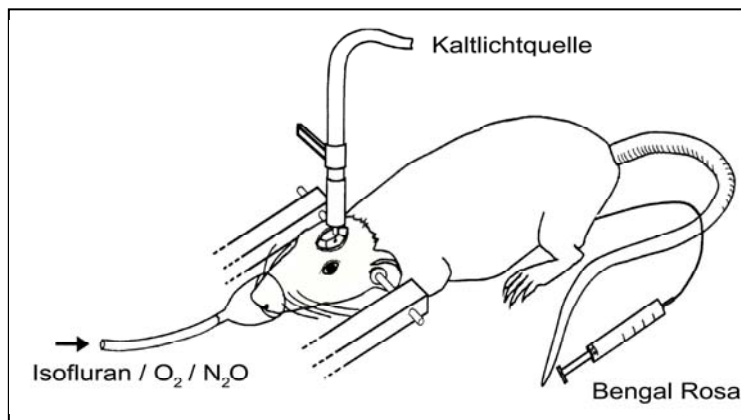


Abb. 6 Schematische Darstellung der Induktion eines photothrombotischen kortikalen Infarktes. Die Tiere werden über eine Atemmaske mit Narkosegas ventiliert. Über einen Venenkatheder wird der photosensitive Farbstoff Bengal Rosa in den Blutkreislauf injiziert, während der Kortex über einen Kaltlichtleiter für 20 min durch die Kalotte hindurch belichtet wird.

Bromodeoxyuridin-Injektionen

Zur Identifizierung von proliferierenden Zellen wurde das Thymidin-Analogon Bromodeoxyuridin (BrdU; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verwendet. Um akute Effekte kortikaler SD auf die Proliferation von Vorläuferzellen aufzudecken, erhielten 5 Gruppen (2 Kontrollgruppen mit jeweils 4 Tieren, 2 SD-Gruppen mit 5 bzw. 6 Tieren und die MK-801-Gruppe) 3 intraperitoneale Injektionen BrdU (50 mg/kg gelöst in 0.9% NaCl) am Tag 2 oder 4 nach Induktion der SD. Die Tiere überlebten jeweils bis zum folgenden Tag. Um einzuschätzen, ob und wieviele der neu gebildeten Zellen überleben, erhielten 2 weitere Gruppen (Kontrollen: n = 4, SD: n = 9) alle 12 Stunden 50 mg/kg BrdU von Tag 1 bis 7. Diese Tiere überlebten für 42 Tage. In gleicher Weise wurde mit den infarzierten Ratten verfahren: 3 x täglich BrdU am Tag 2 oder 4 (jeweils 5 PT- und 4 PT-Kontrolltiere), Überleben bis zum folgenden Tag oder 2 x täglich BrdU für eine Woche und Überleben für weitere 5 Wochen. Eine Übersicht gibt Abb. 7.

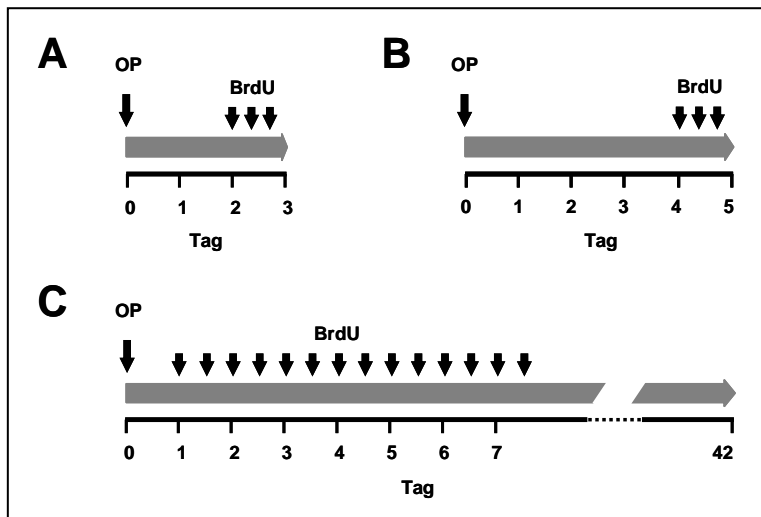


Abb. 7 BrdU-Injektionsprotokoll. SD-/PT- und die entsprechenden Kontrolltiere wurden in 3 Gruppen mit unterschiedlichen BrdU-Injektions-schemen und Überlebenszeiten eingeteilt. Die Eingriffe (OP) erfolgten am d0. Zwei Gruppen erhielten 3 BrdU-Injektionen am d2 (A) oder 4 (B) und wurden am folgenden Tag getötet. Einer weiteren Gruppe wurde ab Tag 1 für 1 Woche alle 12 h BrdU gespritzt, diese Tiere überlebten bis zum d42 (C).

Gewebepräparation

Die Tiere wurden unter tiefer Äthernarkose transkardial zunächst mit 90 ml PBS, dann mit 300 ml 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0.1 M Phosphatpuffer perfundiert. Die Hirne wurden vorsichtig aus dem Schädel herauspräpariert und über Nacht bei 4°C in 4% PFA nachfixiert. Zum Schutz vor Gefrierschäden wurde das Gewebe für 24 Stunden in 10%-ige und anschließend für 48 Stunden in 30%-ige Succrose verbracht (4°C). Zur Aufbewahrung wurden die Hirne in -25 bis -30°C kaltem Methylbutan eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die histo- und immunhistochemischen Färbungen wurden am Gefriermikrotom 40 µm dicke koronale Schnitte angefertigt und in Anti-Freeze-Lösung bei -20°C aufbewahrt.

BrdU-Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Zur *free-floating* Peroxidase Färbung wurde jeder 6. Schnitt mehrmals in TBS gewaschen, für 30 min in 0.18% H₂O₂ geblockt, dreimal gewaschen und zur Denaturierung der nukleären DNA für 30 min bei 37°C in 2 N HCl inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 10 min in 0.1 M Borsäure inkubiert und nochmals in TBS gewaschen. Zum Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen verblieben die Schnitte für 1 Stunde bei RT in TBS plus. Die Antikörperverdünnung erfolgte ebenfalls in diesem Puffer. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C im primären Antikörper inkubiert. Nach mehrmaligem intensivem Waschen in TBS erfolgte die Inkubation im biotinylierten Sekundärantikörper für 2 Stunden bei RT, gefolgt von weiteren Waschschritten. Nach einstündiger Behandlung des Gewebes mit ABC-Reagenz (Vectastain Elite Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) bei RT und

anschließendem Waschen in TBS erfolgte die Peroxidasereaktion. Hierfür wurden die Schnitte 12 min in DAB inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden die gefärbten Schnitte in 0.5%-iger Gelatinelösung auf Objektträger aufgezogen, über Nacht getrocknet und in Entellan eingedeckelt.

Zur Immunfluoreszenzmarkierung wurde jeder 12. Schnitt verwendet und zunächst in derselben Weise prozessiert wie im vergangenen Abschnitt beschrieben. Die Blockierung endogener Peroxidasen mit H_2O_2 entfiel. Die Schnitte wurden für 48 Stunden bei 4°C in primärem Antikörper inkubiert, mehrmals in TBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit sekundärem Antikörper behandelt. Am Ende wurden die Schnitte gewaschen, aufgezogen und in Mowiol eingedeckelt. Folgende Antigene wurden detektiert: BrdU; DCX, als Marker neuronaler Vorläuferzellen; NeuN, um reife Neuronen zu identifizieren; als astrozytäre Marker S100 β und GFAP. Zur Detektion apoptotischer Zellen wurde jeder 24. Schnitt mit Antikörpern gegen BrdU und aktive Caspase-3 inkubiert. Listen der verwendeten primären und sekundären Antikörper befinden sich in Tabelle 3.

Tabelle 3 Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
<i>primäre Antikörper</i>		
Ratte anti-BrdU	1:500	Oxford Biotechnology, Kidlington, UK
Ziege anti-DCX	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Maus anti-NeuN	1:500	Chemicon, Temecula, CA, USA
Kaninchen anti-S100 β	1:2500	Swant, Bellinzona, Schweiz
Meerschweinchen anti-GFAP	1:500	Advanced ImmunoChemical, Long Beach, CA, USA
Kaninchen anti-cleaved Caspase-3	1:100	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
<i>sekundäre Antikörper</i>		
Rhodamine-X Esel anti-Ratte	1:250	Dianova, Hamburg, Deutschland
Rhodamine-X Esel anti-Kaninchen	1:250	Dianova, Hamburg, Deutschland
Alexa-488 Ziege anti-Ratte	1:250	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Alexa-488 Ziege anti-Meerschweinchen	1:250	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Alexa-488 Esel anti-Kaninchen	1:250	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Cy5 Esel anti-Maus	1:250	Dianova, Hamburg, Deutschland
Cy5 Esel anti-Ziege	1:250	Dianova, Hamburg, Deutschland
Biotin Esel anti-Ziege	1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland
Biotin Esel anti-Ratte	1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland

Volumetrie

Die Applikation der 3 M Salzlösungen verursachte eine kleine nekrotische Läsion im kortikalen Gewebe. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Gewebsschaden und der Neurogenese im Gyrus dentatus auszuschließen, wurden volumetrische Analysen der Läsionen durchgeführt. Zur histologischen Färbung wurden die 40 μ m-Hirnschnitte (jeder 6.) in 0.5%-iger Gelatinelösung auf

Objektträger aufgezogen und getrocknet. Es folgte eine 8 minütige Inkubation in 60°C heißer Kresylviolettlösung und ein Spülschritt in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$. Dann wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol, je 2 x 1 min 70%, 96%, 100%) dehydriert, 5 min in Xylol inkubiert und mit Entellan eingedeckelt.

Um das Läsionsvolumen zu bestimmen wurden die Schnitte auf einem helligkeitsstabilisierten Leuchttisch (Imaging Research Inc., Model B95) aufgelegt und mit einer CCD-Kamera (Mandi, YG 9220) aufgenommen. Das Kamerasignal wurde dann über einen Video-Prozessor (Hamamatsu, DVS-3000) nachverstärkt, digitalisiert und an einen MacIntosh IIfx übertragen. Die Analyse der Flächendaten erfolgte mit einem konventionellen Bildverarbeitungsprogramm (NIH-Image 1.44).

Die Abschätzung des Läsionsvolumens erfolgte durch Integration der Flächeninhalte mit der Dicke und den Abständen der Schnitte ($V = A [\text{mm}^2] \times 0.04 \text{ mm} \times 6$).

Quantifizierung und statistische Analysen

Zur Bestimmung der Gesamtzahl BrdU-markierter Zellkerne im Gyrus dentatus wurde jeder 6. Peroxidase-gefärbte Schnitt an einem Zeiss Axioplan 2 bei 20- bis 40-facher Vergrößerung ausgewertet. Ipsi- und kontralateraler Gyrus dentatus wurden getrennt auszählt. Zur Hochrechnung auf die Absolutmenge BrdU-positiver Zellen im kompletten ipsi- bzw. kontralateralen Gyrus dentatus eines Tieres wurden die Zellzahlen addiert und mit 6 multipliziert.

Zur Auswertung der Mehrfachimmunfluoreszenzen wurde jeder 12. Schnitt auf die Kolo-kalisation verschiedener Marker mit BrdU untersucht. Dafür wurden von zufällig ausgewählten Bereichen des Gyrus dentatus z-stacks (z-Ausdehnung ca. 20 μm) an einem konfokalen Lasermikroskop (LSM 510, Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen und sowohl ipsi- als auch kontralateral jeweils 50 BrdU-positive Zellen phänotypisiert. Hieraus wurde der prozentuale Anteil der mehrfach markierten Zellen ermittelt und durch Multiplikation mit der Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen in Absolutzahlen umgerechnet.

Unter Berücksichtigung des z.T. kleinen Gruppenumfanges wurden die statistischen Analysen m.H. nicht-parametrischer Tests durchgeführt. Der Vergleich abhängiger Stichproben erfolgte mit dem exakten Vorzeichentest, der von unabhängigen Stichproben mit dem exakten Mann-Whitney Test (2-seitig). Das statistische Signifikanzniveau wurde für $p \leq 0.05$ gesetzt. Alle angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert (MW) \pm SEM.

Projekt 3: Verhaltenstests

Um die Konsequenzen von kortikalen SD auf die kognitive Leistung der Ratten zu ermitteln (eventuell verursacht durch erhöhte Neurogenese im Gyrus dentatus), wurden zwei Paradigmen zur Erfassung des räumlichen Lernens und des Gedächtnisses der Tiere verwendet – das Morris Water Maze (MWM; [153, 154]) und eine modifizierte Form des MWM [155]. Die Testapparatur bestand aus einem runden Wasserbecken (\varnothing 181 cm), in dem sich 1.5 cm unter der Wasseroberfläche eine Plattform (\varnothing 16 cm) befand. Die Wassertemperatur betrug 21-22°C. Das Becken befand sich in einem Raum mit verschiedenen visuellen Landmarken (Poster, Lampen, Experimentator etc.), die im Verlauf des Tests unverändert blieben. Typischerweise lernen die Tiere in diesem Test, aus dem Wasser zu entkommen, indem sie sich mit Hilfe der visuellen Landmarken im Raum orientieren und die Plattform lokalisieren. Der Antrieb dazu resultiert aus der aversiven Haltung der Tiere gegenüber dem Wasser. Das Becken wurde in 4 virtuelle Quadranten eingeteilt (NO, NW, SO, SW). Die Aufzeichnung der einzelnen Versuchsdurchgänge erfolgte durch eine sich über dem Becken befindende Videokamera (ca. 150 cm über der Wasseroberfläche), die sowohl mit einem Videorecorder als auch mit einem PC verbunden war. Die einzelnen Tests wurden computerbasiert mittels EthoVision-Software (Noldus, Wageningen, Niederlande) digitalisiert und gespeichert.

Testbeginn war in allen Gruppen 35 Tage nach SD- oder Sham-Operation. Davor wurden die Tiere an 3 aufeinanderfolgenden Tagen an den Experimentator gewöhnt. Dazu wurden sie mehrmals aus dem Käfig herausgehoben und wieder abgesetzt.

Traditionelles Morris Water Maze

Das traditionelle MWM besteht aus einer Reihe von *training trials* (Akquisitionsphase) gefolgt von sog. *probe trials* (Extinktionsphase). In den *training trials* befindet sich die Plattform in einer konstanten Position relativ zu den externen Umgebungsreizen. Das Tier wird an einem von 4 virtuellen Startpunkten (N, W, O, S) mit dem Kopf zum Beckenrand ins Wasser eingesetzt (Abb. 8). Anschließend hat es die Möglichkeit, innerhalb einer festgelegten Zeitspanne die unsichtbare Plattform aufzusuchen und dort zu verweilen. Nach einem bestimmten Intertrial-Intervall wiederholt sich dieser Vorgang, wobei die Ratte an einer anderen Position ins Becken gesetzt wird. Typischerweise durchlaufen die Tiere 4 bis 8 Versuche täglich über mehrere Tage hinweg. In dieser Trainingsphase wird die Zeit oder die zurückgelegte Strecke, die sie zum Erreichen der Plattform benötigen, aufgezeichnet. Da die Plattform unsichtbar ist, sind die Tiere auf ihr räumliches Gedächtnis

angewiesen, um sie zu lokalisieren. An das Training schließt sich oftmals ein *probe trial* an, in dem die Plattform aus dem Becken herausgenommen wird und die Tiere an einem Punkt starten, der dem Zielquadranten (in dem sich vorher die Plattform befand) gegenüberliegt. Hier wird Zeit, die die Tiere im Zielquadranten mit der Suche nach der Plattform verbringen, gemessen.

Durchführung

Einen Tag vor Beginn des Tests wurden die Tiere ($n = 9$ SD, $n = 6$ Sham) an das Becken adaptiert. Hierfür mussten sie 60 s im Becken ohne Plattform schwimmen. Daran schloss sich eine 7-tägige Akquisitionsphase mit je 4 *training trials* pro Tag an, wobei jede Startposition randomisiert einmal pro Tag verwendet wurde (Tabelle 4). Die Sequenz der Startpositionen änderte sich täglich, war jedoch in allen Untersuchungsgruppen gleich. Die Plattformposition blieb immer konstant. Die Länge der einzelnen Versuche wurde auf 90 s festgesetzt. Bei Erreichen der Plattform vor Ablauf dieser Zeit, bei dem das erfolgreiche Erklimmen der Plattform mit allen vier Pfoten als Kriterium diente, konnten die Tiere für 20 Sekunden auf der Plattform verweilen. Falls ein Tier die Plattform nicht innerhalb 90 s finden konnte, wurde es vom Experimentator auf die Plattform gesetzt und verblieb dort ebenfalls 20 s. Das anschließende Intertrial-Intervall betrug 30 s, währenddessen wurden die Ratten in ihren Käfig zurückgesetzt (Rotlicht), dann begann der nächste Versuch.

Am Ende des Trainings schloss sich direkt nach dem letzten *training trial* und einem 30 s Intertrial-Intervall der erste *probe trial* (60 s) an. Zwei weitere *probe trials* wurden 2 und 5 Wochen später durchgeführt (d56 und d77 nach SD), um zu evaluieren, ob und wie lange die im Training erworbene räumliche Landkarte im Gedächtnis behalten wird.

Während der *training trials* wurde die Zeit, die die Tiere zum Erreichen der Plattform benötigen und die sie im Zielquadranten verbrachten, zur Auswertung herangezogen. In den *probe trials* wurde die im Zielquadranten verbrachte Zeit relativ zu den anderen Quadranten sowie der Anteil des thigmotaktischen Verhaltens (Schwimmen des Tieres im 20 cm breiten Beckenrand; siehe auch Abb. 9C) ermittelt. Außerdem wurde die Schwimmgeschwindigkeit in allen Versuchen analysiert.

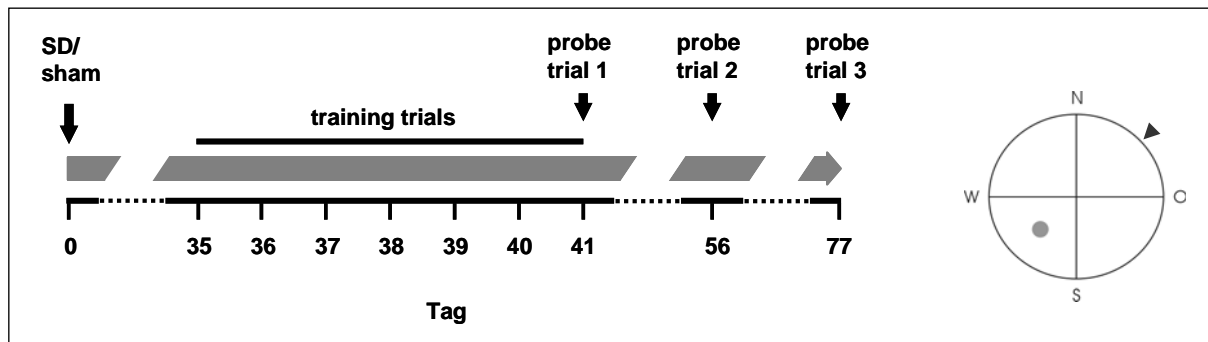


Abb. 8 Schema des Versuchsaufbaus für den traditionellen Morris Water Maze (MWM)-Test. SD- und Sham-operierte Tiere wurden in der 6. Woche nach dem Eingriff getestet. Vom d35 bis d41 bekamen die Tiere jeweils 4 *training trials* pro Tag. Direkt nach dem letzten *trainings trial* wurden sie ohne Plattform in einem ersten *probe trial* getestet. Zwei weitere schlossen sich 2 und 5 Wochen später an. Die rechte Abbildung zeigt den Aufbau des MWM. Während der *training trials* befand sich die Plattform im SW-Quadranten, die Tiere starteten pro Tag jeweils einmal aus jeder Himmelsrichtung. Zur Durchführung der *probe trials* wurde die Plattform entfernt und die Tiere starteten gegenüber dem Zielquadranten (NO; Pfeil).

Tag	Startpositionen			
1	N	O	W	S
2	O	S	N	W
3	W	N	S	O
4	S	W	O	N
5	N	S	W	O
6	O	N	W	S
7	S	O	W	N

Tabelle 4 Startpositionen im Standard-Watermaze

Modifiziertes Morris Water Maze

Das Verhalten einer weiteren Gruppe von Ratten ($n = 8$ SD, $n = 5$ Sham) wurde in einem abgewandelten MWM getestet [155], welches die Analyse zusätzlicher kognitiver Parameter zulässt: 1) die Entwicklung des Gedächtnisses zur räumlichen Orientierung kann bereits in der Trainingsphase beurteilt werden (verschmelzen von Akquisitions- und Extinktionsphase) und 2) nicht nur das Referenzgedächtnis, sondern auch die Fähigkeit die Suchstrategie zu ändern, kann evaluiert werden. Schon während des einfachen MWM-Trainings (Plattformposition konstant) nutzen Ratten oder Mäuse ein Arsenal verschiedener kognitiver und nicht-kognitiver Suchstrategien, um aus dem Wasser zu entkommen. In einer neuen Umgebung ist ihr Explorationsverhalten zunächst durch Thigmotaxis (Reaktion auf Berührungsreize, instinktiv) geprägt [156, 157]. Im MWM äußert sich dieses Verhalten dahingehend, dass die Tiere während der Habituationsphase und z.T. auch noch in den ersten Versuchsdurchgängen primär am Rand des Beckens entlang schwimmen. Gleichzeitig versuchen sie immer wieder, an der Wand des Beckens hinaufklettern. Nach und nach ändert sich das

Schwimmverhalten, die Ratten beginnen sich zunächst nur kurz und dann immer weiter von der Peripherie wegzubewegen, um das Becken zu durchstreifen. Im Zuge dessen stoßen die Tiere auf die verborgene Plattform. Nun müssen die Tiere lernen, dass es eine und genau diese Lösung gibt, aus dem Wasser zu entkommen (bis hierhin erfordert der Test v.a. prozedurales Lernen). Anschließend müssen sie sich die Plattformposition einprägen und lernen, sich anhand von distalen Landmarken zu orientieren und diese zur gezielten Navigation (Interpolation der Plattformposition) zu nutzen [157, 158]. Dieser Test beansprucht sowohl das Arbeits- (kurzzeitig, von *trial* zu *trial*) als auch das Referenzgedächtnis (längerfristig, von Tag zu Tag, Test in *probe trials*).

Der modifizierte Test enthielt folgende Abwandlungen: Während der Trainingsphase befand sich die Plattform zwar immer im selben Quadranten, allerdings an ständig variierenden Positionen. Damit waren die Anforderungen schon zu Beginn des Tests andere. Die Tiere mussten lernen, dass sie innerhalb eines größeren, aber eingegrenzten Areals eine Plattform finden können. Anschließend wurden die Tiere einer völlig neuen Situation ausgesetzt: nun befand sich die Plattform an wechselnden Positionen am Beckenrand. Damit konnte evaluiert werden, wie lange die Gedächtnisspur des früheren Zielquadranten erhalten blieb, ob die Tiere in der Lage waren, eine neue Suchstrategie zu entwickeln (*strategy switching*, resultierend in einer Rückkehr zu thigmotaktischem Verhalten) und wie lange die Tiere dafür benötigten.

Durchführung

Der zeitliche Verlauf des Tests ist in Abb. 9A dargestellt. Die Adaption erfolgte einen Tag vor Versuchsbeginn, indem die Ratten für 30 s auf die unter der Wasseroberfläche liegende Plattform gesetzt wurden. Es schlossen sich 4 Tage mit jeweils 4 *training trials* an (Abb. 9B). Die Sequenz der Plattform- und Startpositionen war dabei für alle Tiere gleich, ein Versuch dauerte maximal 90 s, anschließend blieben die Ratten für weitere 20 s auf der Plattform sitzen.

Am vierten Versuchstag schloss sich unmittelbar nach dem letzten *training trial* ein 30-sekündiger *probe trial* an. Dieser wurde ohne Plattform durchgeführt, die Tiere starteten im dem Zielquadranten gegenüberliegenden Quadranten (NO).

Nachdem die Ratten die Position der Plattform gelernt hatten, wurde ein sog. *strategy switching test* durchgeführt. Hier wird geprüft, inwiefern die Tiere in der Lage sind, von der zuvor erworbenen Suchstrategie (Plattform im SW-Quadranten) auf eine andere umzulernen. Dazu wurde die Plattform an wechselnden Positionen am Beckenrand aufgestellt. Die Tiere hatten je 6 Versuche an Tag 5 und

6, Start- und Plattformpositionen waren für alle Versuchsgruppen identisch (Abb. 9B). Die Ratten hatten 90 s Zeit, die Plattform zu lokalisieren, und 20 s, um sich nach jedem Versuch auf der Plattform aufzuhalten.

Unmittelbar nach dem letzten Versuch am Tag 6 schloss sich ein zweiter *probe trial* (*strategy probe test*) an, um die Strategie-Präferenz der Tiere zu testen. Die Plattform wurde aus dem Becken entnommen und die Tiere schwammen für 30 s von NO startend. Ein weiterer *strategy probe* Test (*probe trial 3*) wurde am Tag 7 durchgeführt.

In diesem Test wurden folgende Parameter analysiert: 1) die Zeit, die die Tiere im Zielquadranten verbrachten, 2) die Zeit, die sie sich in der Peripherie aufhielten (20 cm Beckenrand) und 3) die Schwimmgeschwindigkeit. Die Berechnungen erfolgten jeweils relativ zu den anderen Bereichen.

Statistik

Zur Analyse der in der Lernphase gemessenen Parameter wurden die Tagesmittelwerte und zur besseren Aufschlüsselung der Daten auch die Mittelwerte für die einzelnen *trials* berechnet. Zur Berechnung der Niveauunterschiede zwischen den Lernkurven wurde der Mittelwert aus den Tagesmittelwerten gebildet. Die Auswertung der *probe trials* in der Extinktionsphase erfolgte durch Mittelwertbildung innerhalb der Gruppen.

Die statistischen Analysen wurden für unabhängige Stichproben mit Hilfe des Mann-Whitney- (nicht-parametrisch, exakt 2-seitig) und für abhängige mit dem Wilcoxon-Test (nicht-parametrisch, exakt 2-seitig) durchgeführt. Das statistische Signifikanzniveau wurde für die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0.05$ festgesetzt. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte (MW) \pm SEM.

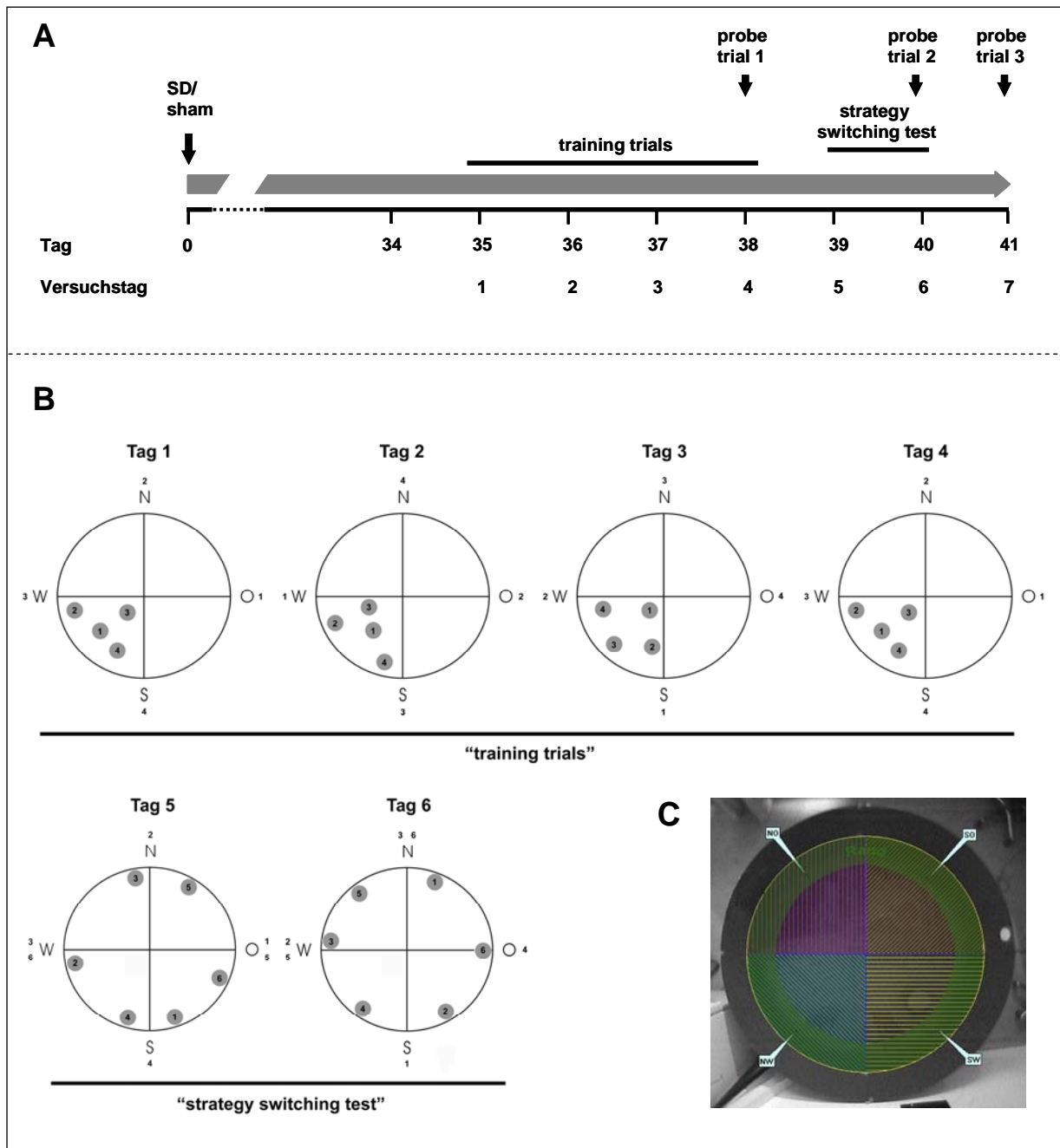


Abb. 9 Modifiziertes Water Maze. **(A)** Versuchsablauf. Der Test erfolgte in der 6. postoperativen Woche. Nach der Habituation wurden die Tiere zunächst für 4 Tage trainiert, eine Plattform im SW-Quadranten zu finden. Unmittelbar nach dem letzten Training wurde ein *probe trial* ohne Plattform durchgeführt (d4). An den folgenden beiden Tagen schloss sich der *strategy switching test* an, bei dem sich die Plattform am Rand des Beckens befand. Direkt im Anschluss und am Tag 7 wurden 2 weitere *probe trials* durchgeführt, wobei die Ratten im NO-Quadranten starteten. **(B)** zeigt den Versuchsaufbau mit den Start- und Plattformpositionen an den einzelnen Tagen. Die grauen Kreise sollen die Plattform darstellen, die Ziffern bezeichnen die einzelnen Versuche pro Tag und deren Reihenfolge gibt Aufschluss über die Kombination von Plattform- und Startpositionen. **(C)** zeigt ein Standbild des Water Maze mit Quadranten und dem 20 cm breiten Randbereich.

ERGEBNISSE

Die epidurale Applikation von 3 M KCl löste in einem Zeitraum von 100–120 min durchschnittlich 7 ± 2 SD aus, während in keinem der Kontrolltiere SD beobachtet wurden (Abb. 3B). KCl-Tiere mit weniger als 5 SD wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Im Bereich der hinteren Trepanation verursachte die Applikation der hyperosmolaren Salzlösungen kleine kortikale Läsionen. Im Rahmen der Neurogenesestudie wurde eine volumetrische Analyse der Läsionen durchgeführt, auf diese soll an dieser Stelle verwiesen werden.

Projekt 1: Genexpressionsstudie

In diesem Projekt wurde eine Microarray-basierte, genomweite Analyse der Effekte von kortikalen SD auf die Genexpression im ipsilateralen Kortex durchgeführt. Die Validierung erfolgte für ein repräsentatives Set von Transkripten mittels qRT-PCR, zusätzlich wurden immunhistochemische Färbungen für ausgewählte Proteine durchgeführt.

Ergebnisse der Transkriptomanalyse

Die MAS 5.0-basierte Absolutanalyse der Chips ergab, dass von den 15866 analysierten *probe sets* durchschnittlich $57 \pm 1.7\%$ detektiert werden konnten (*present call*), d.h. mehr als die Hälfte der mit dem Chip nachweisbaren Transkripte wurden in den Proben erkannt. Dieser Prozentsatz entsprach den Herstellervorgaben für diesen Chip. Die Proben- und Hybridisierungsqualität wurde zusätzlich durch das Verhältnis der 5' und 3' Signalintensitäten von Housekeeping Genen (*GAPDH*: \emptyset 1.28; *β -Actin*: \emptyset 1.31), Sichtung der Hybridisierungskontrollen und durch vergleichbare Scaling Faktoren (0.194 ± 0.047) validiert.

Eine zusätzliche Transformation der Daten war nicht erforderlich, wie die Scatterplot- und Regressionsanalysen zeigten. Hierfür wurden die aus der Absolutanalyse hervorgegangenen Signalintensitäten jedes Zeitpunktes paarweise (Kontrolle vs. SD) in einem Plot aufgetragen und einer linearen Regression unterzogen. Die Regressionsgeraden wichen nur unwesentlich von den Diagrammdiagonalen ab, die Daten waren sehr gut miteinander korreliert ($R^2 > 0.93$, Abb. 10A).

Die nach der MAS 5.0 basierten Vergleichsanalyse identifizierten signifikant regulierten Gene sind in Abb. 10A schwarz markiert. Die Abbildung illustriert, dass die deutlichsten Effekte nach 3h zu

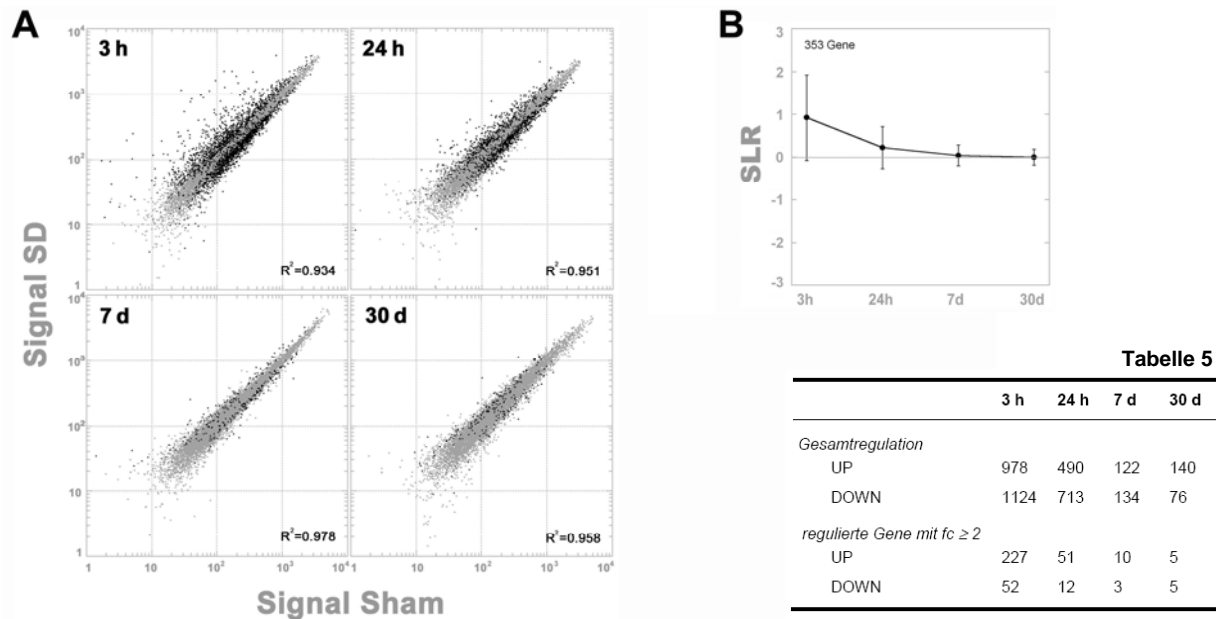


Abb. 10 (A) Scatterplots der mittleren Signalintensitäten der exprimierten Gene im ipsilateralen HL-Kortex von SD- und Kontrolltieren. Ein Punkt entspricht einem *probe set*, wobei dessen X-Position den Signalwert in der Sham-Probe, die Y-Position den der SD-Probe definiert. Die Daten wurden vorher durch globales Scaling normalisiert, Gene mit *absent* oder *marginal call* auf allen Chips sind nicht dargestellt. Schwarze Punkte kennzeichnen differentiell exprimierte Gene, graue Punkte die nicht regulierten Gene. **(B)** Centroid-Ansicht der 353 Gene, deren Expression durch SD verändert wurde (≥ 2 -fach). Die *signal log ratios* (SLR) aller regulierten Gene eines Zeitpunktes wurden gemittelt. Die Abbildung verdeutlicht, dass der Betrag der Regulationen zu den frühen Zeitpunkten zugunsten der Heraufregulationen verschoben ist (= Mean \pm SD).

Tabelle 5 Anzahl der durch SD differentiell exprimierten Gene. Die oberen Werte repräsentieren die regulierten Gene nach Anwendung aller Ausschlußkriterien, jedoch ohne *fold change-cut off*. Unten ist die Anzahl der Gene gezeigt, welche mindestens 2-fach reguliert ist.

beobachten waren und dass die Anzahl regulierter Gene sukzessive im Zeitverlauf abnahm. Weiterhin zeigen die Scatterplots, dass der Betrag der Heraufregulationen zu den frühen Zeitpunkten den der Herunterregulationen überstieg (siehe auch Abb. 10B). Diese Beobachtung basiert hauptsächlich auf einer stärkeren Regulation (*fold change*) und nicht auf einer größeren Anzahl der heraufregulierten Gene, wie Tabelle 5 veranschaulicht.

Nach Anwendung sämtlicher Ausschlusskriterien verblieben 353 Gene (Tabellen A-E im Anhang), die zu mindestens einem Zeitpunkt ≥ 2 -fach reguliert waren. Basierend auf ihrem Proteinprodukt wurden diese Gene in funktionelle Gruppen kategorisiert (Tabellen 6-16). Die 12 am stärksten betroffenen Gruppen waren: [1] IEG und Transkriptionsfaktoren (39 Gene), [2] Immunantwort/Inflammation (8 Gene), [3] Signaltransduktion (24 Gene), [4] Transporter (20 Gene), [5] Stressantwort (9 Gene), [6] extrazelluläre Matrix (7 Gene), [7] Zytoskelett (11 Gene), [8] Metabolismus (19 Gene), [9] Zellkommunikation u./o. synaptische Transmission (12 Gene), [10] Wachstum und Differenzierung (9 Gene), [11] Zelladhäsion und Membran (12 Gene) und [12] Zellzyklus (3 Gene).

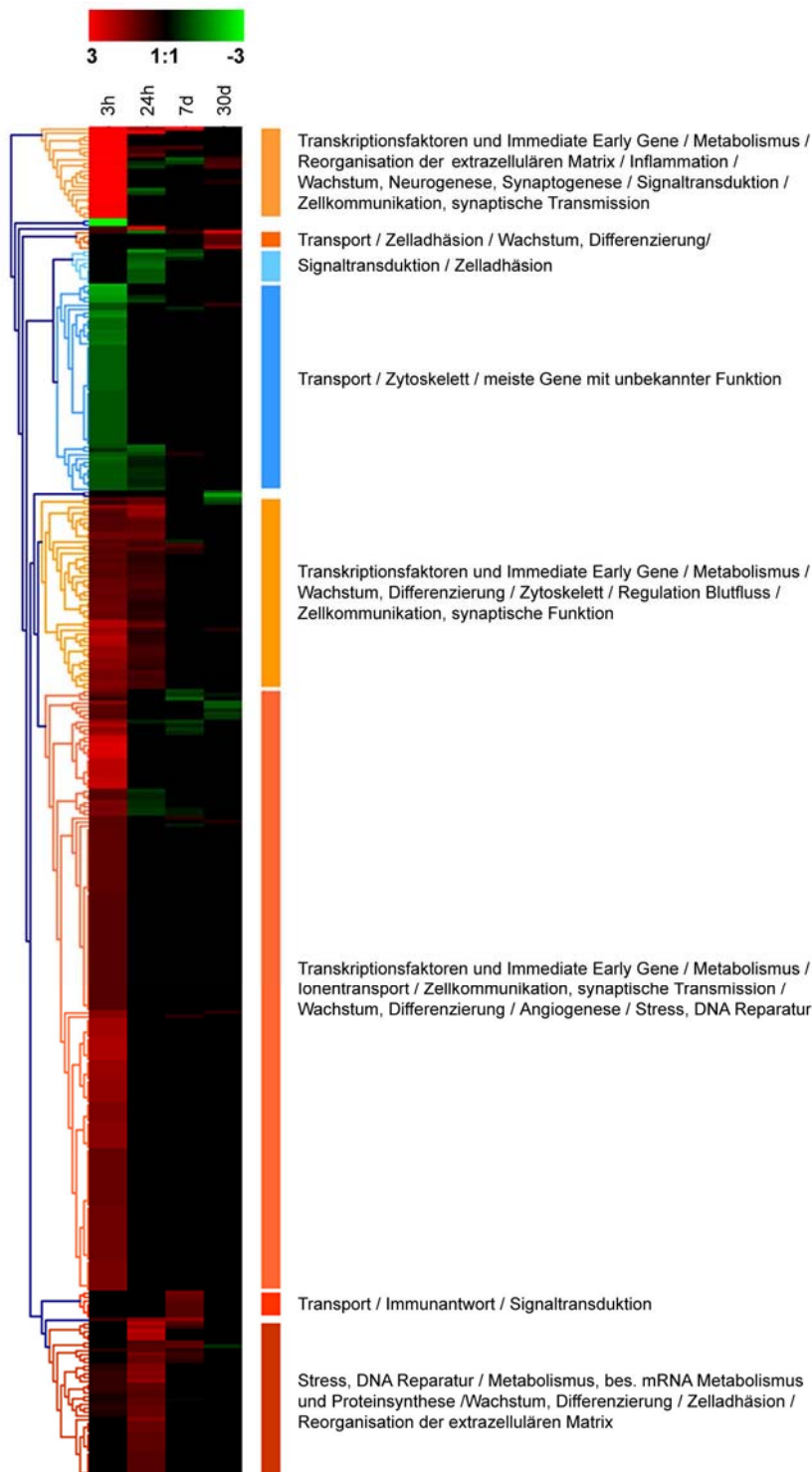


Abb. 11 Kortikales Genexpressionsprofil nach SD. Die 353 mindestens 2-fach regulierten Gene wurden hierarchisch geclustert (Genesis 1.5.0; Euclidische Distanz, Average Linkage, Distanz-schwelle 0.05), den resultierenden Clustern wurden biologische Prozesse bzw. molekulare Funktionen zugeordnet. Der Clusteralgorithmus ordnet die Gene entsprechend der Ähnlichkeit ihres Expressionsmusters basierend auf den *signal log ratios* (SLR). Die Farben repräsentieren die SLR relativ zur Kontrolle, d.h. rot codiert Herauf-, grün Herabregulation. Das Maximum wurde zur besseren Darstellbarkeit der schwächeren Regulationen auf SLR von ± 3 (=fold change von 8 bzw. 0.125) begrenzt.

Zur Identifizierung von Gruppen ähnlich exprimierter Gene wurde eine Clusteranalyse nach Sturn *et al.* [148] durchgeführt und die daraus resultierenden Cluster m.H. des NetAffx Gene Ontology Mining Tool (www.affymetrix.com) funktionellen Kategorien zugeordnet. In Abb. 11 ist das Ergebnis dieser Analyse dargestellt. Die meisten der beobachteten Veränderungen besaßen transienten Charakter

und traten bereits 3 h nach SD auf. Zu diesem Zeitpunkt waren hauptsächlich die IEG und Transkriptionsfaktoren (z.B. *c-Fos*, *EGR1*, 2 und 4, *JunB*), Signaltransduktionsmoleküle (z.B. *Stat3*, *JAK2*, *RGS2* und 4, *DUSP6*) sowie Wachstums- und Differenzierungs-assoziierte Gene (z.B. *BDNF*, *trkB*, *NUMB*, *Socs2*) betroffen. Außerdem waren die meisten der Gene, welche mit der Immunantwort (z.B. *MCP-1*, *MIP-1 α* , *MIP-1 β* , *Cox2*), dem Transport (z.B. K^+ und Ca^{2+} Kanäle, *AQP4*), dem

Tabelle 6 Immediate Early Gene und Transkriptionsfaktoren

Genname Markierungen kennzeichnen Genregulationen, die aus der Literatur bekannt sind: schattiert, nach SD; fett, im ipsilateralen "remote" Kortex nach fokaler Ischämie; x, in post-ischämischen Gewebe.	Public ID	Gensymbol	fold change Unterstreichung = signifikant				Ref.
			3h	24h	7d	30d	
x fos-like antigen 2	NM_012954	FOSL2 / FRA2	<u>48.5</u>	-	-	1.6	[3, 7]
x c-fos oncogene	BF415939	c-Fos	<u>19.7</u>	-	<u>-2.0</u>	-	[3, 8-11]
early growth response 4	NM_019137	EGR4 / NGFI-C	<u>19.7</u>	-	-	-	[14]
x activating transcription factor 3	NM_012912	ATF3	<u>16.0</u>	-	-	1.3	[17]
early growth response 2	D83508	EGR2 / KROX20	<u>16.0</u>	-	-	-	[14]
Jun-B oncogene	NM_021836	JunB	<u>10.6</u>	<u>2.1</u>	-	-	[11, 21]
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	NM_031628	NR4A3	<u>9.2</u>	-1.6	-	-	
x cAMP responsive element modulator	NM_017334	CREM	<u>8.6</u>	-	-	1.9	[8]
x activity regulated cytoskeletal-associated protein	NM_019361	ARC	<u>8.6</u>	-1.6	-	1.7	[7]
x nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 / immediate early gene transcription factor NGFI-B	NM_024388	NR4A1 / NGFI-B	<u>7.5</u>	-1.4	-1.6	-	[3, 7, 14]
B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	BI288701	BTG2 / PC3	<u>7.5</u>	-	-	-	[7]
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	AI013390	CITED2	<u>6.5</u>	-	-	-	
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	U72345	NR4A2 / Nurr1	<u>5.3</u>	-	-	-	[14]
x interferon-related developmental regulator 1	NM_019242	IFRD1 / PC4	<u>4.9</u>	-	-	-	[32]
early growth response 2	D83508	EGR2 / KROX20	<u>4.9</u>	-	-	-	[14]
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	AI013390	CITED2	<u>4.6</u>	1.4	-	-	
x nuclear factor, interleukin 3-regulated	NM_053727	NFIL3	<u>4.6</u>	-	-	-	[8]
x v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	BI288619	c-Jun	<u>4.6</u>	1.9	-	1.3	[3, 7, 11, 21]
activity and neurotransmitter-induced early gene protein 4 (ania-4)	NM_021584	ANIA4	<u>3.5</u>	1.5	-	-	
zinc finger protein 36	AB025017	ZFP36 / TTP	<u>3.5</u>	1.7	-	-	
x immediate early response 3	AI176519	LER3	<u>3.5</u>	1.7	-	-	[8]
x early growth response 1 (NGFI-A)	NM_012551	EGR1 / KROX24	<u>3.2</u>	-1.3	-1.6	-	[3, 7, 14, 21]
B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	BI288701	BTG2 / PC3	<u>3.2</u>	-	-	-	[7]
x v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	BI288619	c-Jun	<u>3.0</u>	1.7	-	-	[3, 7, 11, 21]
four and a half LIM domains 2	NM_031677	FHL2	<u>2.8</u>	-	-	-	
Jun dimerization protein 2	NM_053894	JUNDP2	<u>2.8</u>	-	-	-	
x Activity and neurotransmitter-induced early gene 2 (ania-2) mRNA, 3'UTR	AI013468	ANIA2	<u>2.8</u>	-	-	-	[3]
x cAMP responsive element modulator	NM_017334	CREM	<u>2.3</u>	-	-	-	[8]
basic helix-loop-helix domain containing, class B2	NM_053328	BHLHB2	<u>2.1</u>	1.6	-	-	
rad and gem related GTP binding protein 2	NM_022685	REM2	<u>2.1</u>	-	-	-	
PHD finger protein 13 (predicted)	AI102512	Phf13	<u>2.1</u>	-	-	-	
Activity and neurotransmitter-induced early gene 11 (ania-11) mRNA, 3' UTR / Zinc finger protein RIN ZF	BI289112	ANIA-11 / Rinzf	<u>2.1</u>	-	-	-	
B-cell translocation gene 1, anti-proliferative -cell translocation gene 1	NM_017258	BTG1	<u>2.0</u>	-	-	-	
x fos-like antigen 1	NM_012953	FOSL1 / FRA1	<u>2.0</u>	-	-	-	[3]
zinc finger protein 189 (predicted)	AI407872	Zfp189	<u>2.0</u>	-	-	-	
general transcription factor IIH, polypeptide 3 (predicted)	BM385649	Gtf2h3	<u>-13.9</u>	-	-	-	
zinc finger protein 297B (predicted)	AI013512	Zfp297b	<u>-2.1</u>	-	-	-	
ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 2 (predicted)	BI295982	Asb2	<u>-2.0</u>	-	-	-	
activating transcription factor 5	BM391471	ATF5	-	<u>2.0</u>	-	-	

Zytoskelett (z.B. *TPM1*, *MAP2*, *MAP6*), der Kommunikation & Synapsen (z.B. *Homer1*, *Syt4*, *GABBR1*) oder dem Metabolismus (z.B. *Cbr1*, *IDI1*, *eNOS*, *HMGCR*) assoziiert sind, bereits nach 3 h differentiell exprimiert. Die Expression einiger dieser früh regulierten Gene blieb darüber hinaus langfristig verändert (z.B. *Syt4*, *TIMP1*). Vertreter der Stress-assoziierten und DNA-Reparatur-Gene waren kontinuierlich während der ersten 24 h nach SD induziert (z.B. *hsp27*, *hsp32*, *Gadd45a*). Die Gruppe der Zelladhäsions- und Membran-assoziierten Gene wiederum war hauptsächlich 24 h nach SD reguliert (z.B. *CD44*, *GP38*), wenngleich einige Änderungen bereits nach 3 h auftraten (z.B. *ICAM1*). Auch 1 – 4 Wochen nach SD konnte noch eine signifikante Anzahl differentiell exprimierter Gene identifiziert werden (z.B. *CD74*, *Dexras1*, *TTR*). Eine klare Präferenz bestimmter funktioneller Gruppen lag nicht vor.

Tabelle 7 Signaltransduktion

Genname	Public ID	Gensymbol	fold change				Ref.		
			Unterstreichung = signifikant						
			3h	24h	7d	30d			
		dual specificity phosphatase 1 / protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 16	BE110108	DUSP1 / PTPN16	<u>7.5</u>	-	-	-	
		dual specificity phosphatase 1 / protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 16	BE110108	PTPN16 / Dusp1	<u>4.3</u>	-	-1.3	-	
		dual specificity phosphatase 2 (predicted)	AI408580	DUSP2	<u>2.1</u>	-	-	-	
x		dual specificity phosphatase 5 / MAP-kinase phosphatases	NM_133578	CPG21 / DUSP5	<u>13.0</u>	-	-	-	[3]
		dual specificity phosphatase 6 / MAPK phosphatase 3	AI602811	DUSP6 / MKP3	<u>4.0</u>	-	-	-	
		dual specificity phosphatase 6 / MAPK phosphatase 3	AI231350	DUSP6 / MKP3	<u>3.7</u>	-	-	-	
		dual specificity phosphatase 6 / MAPK phosphatase 3	NM_053883	DUSP6 / MKP3	<u>3.7</u>	-	-	-	
		dual specificity phosphatase 14 (predicted) /// similar to Dual specificity phosphatase 14	AI236997	Dusp14	<u>2.0</u>	-	-	-	
		dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2 (predicted)	BM388710	DYRK2	<u>4.6</u>	-	-	-	
		inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II	U96920	INPP4B	-	-	<u>2.3</u>	-	
		protein phosphatase 2C, magnesium-dependent, catalytic subunit	NM_019372	PDP1	<u>2.0</u>	-	-	-	
x		regulator of G-protein signaling protein 2	AY043246	RGS2 / G0S8	<u>4.6</u>	-	-	-	[8]
x		regulator of G-protein signaling protein 2	AY043246	RGS2	<u>3.7</u>	-	-	-	[8]
		regulator of G-protein signaling 4	U27767	RGS4	<u>3.0</u>	-	-1.5	-	[7]
		G protein-coupled receptor kinase 6	NM_031657	GPRK6	<u>2.0</u>	-	-	-1.6	
		RASD family, member 2	BF404624	RASD2	<u>2.0</u>	-	-	-	
		RAS, dexamethasone-induced 1	AF239157	RASD1 / DEXRAS1	-	-1.9	<u>-2.0</u>	-	
		tribbles homolog 1 (Drosophila)	BM387324	Trib1	<u>4.3</u>	1.4	-	-	
x		signal transducer and activator of transcription 3	BI285863	Stat3	<u>2.5</u>	<u>2.5</u>	-	-	[3, 7]
x		Janus kinase 2	NM_031514	JAK2	<u>2.5</u>	1.6	-	-	[3]
		serine threonine kinase pim3	NM_022602	PIM3	<u>2.3</u>	-	-	-	
		Suppressor of cytokine signaling 2	BM384088	Socs2	<u>2.3</u>	-	-	-	
		serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)	AI012590	STK17B / DRAK2	<u>-2.0</u>	-	-	-	
		protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta (predicted)	D10770	Prkacb	<u>2.1</u>	1.4	-	-	
		protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type 2, alpha	AW919085	PRKAR2A	<u>2.0</u>	-	-	-	
		non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1 (predicted)	BM386507	Nck1	<u>-2.1</u>	-	-	-	
		calcium/calmodulin-dependent protein kinase I gamma	AW251224	CAMK1G	<u>2.5</u>	-	-	-	
		calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	X77194	CAMK2D	1.3	<u>2.1</u>	-	-	

Tabelle 8 Immunantwort, Inflammation

Genname Markierungen kennzeichnen Genregulationen, die aus der Literatur bekannt sind: schattiert, nach SD: fett, im ipsilateralen "remote" Kortex nach fokaler Ischämie; x, in post- ischämischen Gewebe.	Public ID	Gensymbol	fold change Unterstreichung = signifikant				Ref.
			3h	24h	7d	30d	
x chemokine ligand 2 / monocyte chemoattractant protein-1	NM_031530	CCL2 / MCP-1	<u>32.0</u>	6.5	-	-	[3, 8, 67]
x small inducible cytokine A4 / lymphocyte-activation gene 1	U06434	CCL4 / MIP-1 β	<u>2.8</u>	-	-	-	[8]
prostaglandin-endoperoxide synthase 2	U03389	PTGS2 / Cox2	<u>14.9</u>	1.6	1.7	-	[62, 63, 159]
x chemokine ligand 3, macrophage inflammatory protein 1- α	U22414	CCL3 / MIP-1 α	<u>2.6</u>	-	-	-	[3, 7, 8]
x Fc receptor, IgG, low affinity III	NM_053843	Fc γ R3	<u>2.5</u>	-	-	-	[8]
interleukin 1 receptor accessory protein	NM_012968	IL1RAP	<u>2.0</u>	-	-	-	
CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility class II antigen-associated)	NM_013069	CD74	-	-	<u>2.0</u>	-	
lectin, galactose binding, soluble 3	NM_031832	LGALS3	-	<u>4.3</u>	<u>2.0</u>	-	

Tabelle 9 Transporter

Genname x kennzeichnet Genregulationen, die in post-ischämischen Gewebe beschrieben wurden.	Public ID	Gensymbol	fold change Unterstreichung = signifikant				Ref.
			3h	24h	7d	30d	
<i>Ionen- und Wassertransport</i>							
potassium channel, subfamily V, member 1	BF391696	KCNV1	<u>2.8</u>	-1.5	-1.2	-	
calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit	AF389419	CACNA1B	<u>2.6</u>	1.6	-	-	
voltage-dependent calcium channel gamma-3 subunit	AF361340	CACNG3	<u>2.5</u>	-	-	-	
potassium voltage-gated channel, subfamily F, member 1	BI282169	KCNF1	<u>2.0</u>	-	-	-	
ATPase, Na+K+ transporting, alpha 1	M74494	ATP1a1	<u>2.0</u>	-	-1.5	-1.2	
ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 3 polypeptide	NM_012506	ATP1a3	<u>2.0</u>	-	-	-	
ATPase, Na+/K+ transporting, beta 2 polypeptide	U45946	ATP1b2	<u>2.0</u>	-	-	<u>-2.0</u>	
solute carrier family 10, member 2	NM_017222	SLC10a2	-	<u>2.1</u>	-	-	
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 25	AI177358	SLC25a25	<u>2.8</u>	-1.4	-	-	
solute carrier organic anion transporter family, member 1a4	U95011	SLCo1a5	<u>-2.0</u>	-1.2	-	-	
x aquaporin 4	NM_012825	AQP4	<u>2.1</u>	-	-	-1.4	[160, 161]
<i>Protein- und Vesikeltransport</i>							
nucleoporin 98	NM_031074	NUP98	<u>9.8</u>	-	-	-	
vesicle-associated membrane protein 1	M24104	VAMP1	<u>3.0</u>	-	-	-	
peroxisomal biogenesis factor 13 (predicted)	AI012951	Pex13	<u>2.0</u>	-	-	-	
translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast)	D63411	Tomm20	<u>2.0</u>	1.4	-	-	
tumor-associated protein 1	NM_017353	TA1 / SLC7a5	<u>3.2</u>	1.7	-	-	
x S100 calcium binding protein A10 (calpactin)	NM_031114	S100A10	-	<u>2.1</u>	-	-	[162]
<i>Steroid-, Fettsäure und Thyroidhormontransport</i>							
carnitine O-octanoyltransferase	J02844	CROT	<u>-2.0</u>	-1.4	-	-	
Transthyretin	NM_012681	TTR	1.6	<u>-2.5</u>	1.4	<u>5.3</u>	
albumin	NM_134326	ALB	-1.9	<u>-2.3</u>	-	-	

Tabelle 10 Stress (Hitzeschockproteine, DNA Reparatur)

Genname Markierungen kennzeichnen Genregulationen, die aus der Literatur bekannt sind: schattiert, nach SD: fett, im ipsilateralen "remote" Kortex nach fokaler Ischämie; x, in post- ischämischen Gewebe.	Public ID	Gensymbol	fold change Unterstreichung = signifikant				Ref.
			3h	24h	7d	30d	
x heat shock 27kDa protein 1	NM_031970	HSPB1 / hsp27	1.7	<u>7.5</u>	-	-	[3, 57, 78, 162, 163]
x heme oxygenase 1	NM_012580	HMOX1 / hsp32	1.2	<u>2.0</u>	-	-	[3, 63, 76, 163]
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 5 (predicted)	BM386741	HSC40 / DNAJB5	<u>3.5</u>	-	-	-	
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1 (predicted)	BM384926	HSPF1	<u>2.5</u>	-	-	-	
x growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	NM_024127	GADD45 α	1.3	<u>2.8</u>	-	-	[162, 163]
x growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma (predicted)	AI599423	Gadd45 γ	<u>9.8</u>	-	-	-	[8]
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta (predicted)	BI287978	Gadd45 β	<u>4.9</u>	-	-	-	
damage-specific DNA binding protein 1	AJ277077	DDB1	-	<u>2.0</u>	-	-	
x metallothionein	AF411318	MT1A	<u>4.0</u>	-	-	-	[3, 8]

Tabelle 11 Metabolismus

Genname		Public ID	Gensymbol	fold change				Ref.
x kennzeichnet Genregulationen, die in post-ischämischen Gewebe beschrieben wurden.				Unterstreichung = signifikant				
				3h	24h	7d	30d	
	Phosphofructokinase, liver, B-type	AI408151	Pfkf	<u>3.5</u>	-	-	-	
	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	NM_053539	IDI1	<u>2.8</u>	-	-	-	
	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	BI290053	IDI1	<u>2.0</u>	-	-	-	
	carbonyl reductase 3 (predicted)	BI282197	Cbr3	<u>32.0</u>	-	-	-	
	ubiquitin-activating enzyme E1-domain containing 1 (predicted)	AI408025	Ube1dc1	<u>2.0</u>	1.5	1.3	-	
	adenylate cyclase activating polypeptide 1	NM_016989	ADCYAP1	<u>2.5</u>	-	-1.6	-	
x	3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-Coenzyme A reductase	NM_013134	HMGCR	<u>4.0</u>	1.6	-	-	[8]
x	3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-Coenzyme A reductase	BM390399	HMGCR	<u>2.3</u>	-	-	-	[8]
	prostaglandin E synthase	AF280967	PTGES	<u>2.0</u>	-	-	-	
	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1	M83745	PCSK1	<u>2.1</u>	-	-	-	
	methionine adenosyltransferase II, alpha	NM_134351	MAT2A	<u>2.0</u>	<u>2.1</u>	-	-	
	Branched chain aminotransferase 1, cytosolic	BF393120	Bcat1	<u>2.0</u>	-	-	-	
	selenophosphate synthetase 2 (predicted)	AA799700	Sephs2	<u>-2.0</u>	-	-	-	
	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	NM_012634	PRPS2	-	-	-	<u>-2.0</u>	
	glutaminase 2 (liver, mitochondrial)	J05499	GA / GLS2	-	<u>-2.0</u>	-1.3	-	
	nitric oxide synthase 3, endothelial cell	AJ011116	NOS3 / eNOS	<u>2.0</u>	2.5	-	-	
mRNA Metabolismus und Proteinsynthese								
	ribosome associated membrane protein 4	AI103695	RAMP4	<u>2.3</u>	1.5	-	-	
	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1	BI284436	EIF4A1	1.5	<u>2.1</u>	-	-	
	elongation factor RNA polymerase II 2 (predicted)	BI291626	Eli2	<u>2.0</u>	-	-	-	
	CTD-binding SR-like rA1	NM_019384	SR-A1	1.9	<u>2.1</u>	-	<u>-2.1</u>	
	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	NM_057141	HNRPK	-	<u>2.0</u>	-	-	

Tabelle 12 Zellkommunikation, Synapsen-assoziierte Gene

Genname			fold change				Ref.	
Markierungen kennzeichnen Genregulationen, die aus der Literatur bekannt sind: schattiert, nach SD; fett, im ipsilateralen 'remote' Kortex nach fokaler Ischämie; x, in post-ischämischen Gewebe.	Public ID	Gensymbol	Unterstreichnung = signifikant					
			3h	24h	7d	30d		
	homer homolog 1 (Drosophila), neuronal immediate early gene, 1	AF030088	Homer1	<u>14.9</u>	<u>-2.1</u>	-	-	
x	synaptotagmin 4	L38247	SYT4	<u>4.3</u>	<u>2.5</u>	-	-	[164]
	syntaxin 1a (brain)	NM_053788	STX1A	<u>2.1</u>	-	-	-	
	syntaxin binding protein 1	U06069	STXBP1	<u>2.3</u>	1.4	-	-	
x	VGF nerve growth factor inducible	NM_030997	VGF	<u>3.0</u>	1.6	-	-	[7]
	chondroitin sulfate proteoglycan 5 / neuroglycan C	AF292102	CSPG5	<u>2.3</u>	1.6	1.9	-	
	RING finger protein LIRF	NM_134374	LIRF / Rnf39	<u>3.0</u>	-	1.3	-	
x	secretogranin 2	NM_022669	SgII / CgC	<u>3.2</u>	-	-	-	[7, 59]
	glutamate decarboxylase 1	M38350	GAD1	<u>2.5</u>	-	-	-	
	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1	Y10369	GABBR1	<u>2.0</u>	1.7	-	-	
	G protein-coupled receptor 149	AY030276	Gpr149	<u>-3.7</u>	-	-	-	
	adrenergic receptor, beta 1	NM_012701	ADRB1	<u>2.1</u>	-	-	-	

Tabelle 13 Extrazelluläre Matrix

Genname			fold change				Ref.
Markierungen kennzeichnen Genregulationen, die aus der Literatur bekannt sind: schattiert, nach SD; x, in post-ischämischen Gewebe.	Public ID	Gensymbol	Unterstrichung = signifikant				
			3h	24h	7d	30d	
x tissue inhibitor of metalloproteinase 1	NM_053819	TIMP1	9.2	4.3	8.0	-	[8, 165, 166]
tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_021989	TIMP2	1.3	2.0	1.4	-	
tissue factor pathway inhibitor 2	AI179507	TFPI2	2.5	-	-	-	
Serine protease inhibitor	NM_031531	SPIN2C	-	2.0	-	-	
procollagen, type IX, alpha 1 (predicted)	BM388861	Col9a1	8.0	-	-	-	
natriuretic peptide precursor type A	NM_012612	NPPA / ANP	2.1	-	-	-	[67, 68]
Thrombospondin 2 (predicted)	AI406660	TSP-2	5.7	-	-	-	

Tabelle 14 Zytoskelett

Genname x kennzeichnet Genregulationen, die in post-ischämischen Gewebe beschrieben wurden.	Public ID	Gensymbol	fold change Unterstreichung = signifikant				Ref.
			3h	24h	7d	30d	
actin, beta	NM_031144	ACTB	1.5	<u>3.2</u>	-	-	
actin, beta	NM_031144	ACTB	1.3	<u>2.3</u>	-	-	
actin related protein 2/3 complex, subunit 4 (predicted)	AI411582	Arpc4	<u>2.1</u>	-1.5	-	-	
Filamin C, gamma (actin binding protein 280) (predicted)	AI103600	---	-	2.1	-	-	
CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	BG380723	CAP1	<u>2.1</u>	1.5	-	-	
Wiskott-Aldrich syndrome-like (human)	BG375480	Wasl	<u>2.1</u>	-	-	-	
tropomyosin 1, alpha	AF372216	TPM1	<u>2.6</u>	1.7	-	-	
tropomyosin 1, alpha	NM_019131	TPM1	<u>2.3</u>	-	-	-	
tropomyosin 1, alpha	AF370889	TPM1	<u>2.3</u>	1.9	-	-	
tropomyosin 1, alpha	AA875132	TPM1	<u>2.1</u>	-	-	-	
x microtubule-associated protein 2	X74211	MAP2	<u>2.3</u>	1.7	-	-	[3]
microtubule-associated protein 6	AJ002556	MAP6	<u>2.5</u>	-	-	-	
Kinesin family member 1B	BE109334	Kif1b	<u>2.5</u>	-	-	-	
reversion induced LIM gene	NM_017062	RIL	-	<u>2.3</u>	1.5	-	
x calponin 3, acidic	BI274457	CNN3	-	<u>2.3</u>	1.3	-	[162]

Tabelle 15 Zelladhäsion, Membran

Genname x kennzeichnet Genregulationen, die in post-ischämischen Gewebe beschrieben wurden.	Public ID	Gensymbol	fold change Unterstreichung = signifikant				Ref.
			3h	24h	7d	30d	
<i>Zelladhäsion</i>							
intercellular adhesion molecule 1	NM_012967	ICAM1	<u>4.0</u>	-	-	-	
protocadherin 8	NM_022868	PCDH8	<u>4.0</u>	-	-	-	
CEA-related cell adhesion molecule 9	NM_053919	CEACAM9	-	-	-	<u>2.0</u>	
camello-like 3	AF187814	CML3	-	<u>-3.0</u>	-1.6	-	
camello-like 5	AI717047	CML5	-	<u>-2.0</u>	-	-	
claudin 11	NM_053457	CLDN11	1.4	<u>2.1</u>	-	-1.6	
x cysteine rich protein 61	NM_031327	CYR61	<u>3.0</u>	-	-	-	[8, 17]
<i>Membran-assoziierte Gene</i>							
x CD44 antigen	NM_012924	CD44	-	<u>4.0</u>	-	-	[162, 163]
x CD44 antigen	BI302830	CD44	-	<u>4.0</u>	-	-	[162, 163]
x CD44 antigen	AF065147	CD44	-	<u>3.5</u>	1.5	-	[162, 163]
glycoprotein 38	NM_019358	GP38	-	<u>2.6</u>	1.6	-	
glycoprotein (transmembrane) NMB	NM_133298	GNMB	-	1.9	<u>2.0</u>	-	
hyaluronan and proteoglycan link protein 2 / brain link protein 1	AI145465	BRAL1	1.2	<u>2.1</u>	-1.1	-	
epithelial membrane protein 1	BI275741	EMP1	<u>2.1</u>	<u>3.2</u>	-	-	

Tabelle 16 Wachstum und Differenzierung

Genname			fold change				Ref.
Markierungen kennzeichnen Genregulationen, die aus der Literatur bekannt sind: schattiert, nach SD: fett, im ipsilateralen "remote" Kortex nach fokaler Ischämie: x, in post-ischämischen Gewebe.	Public ID	Gensymbol	Unterstreichung = signifikant				
			3h	24h	7d	30d	
x brain derived neurotrophic factor	X67108	BDNF	14.9	-	-	-	[8, 9, 65, 167]
neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	M55292	NTRK2 / TRKB	3.0	-	-	-2.0	[65]
fibroblast growth factor 12	AW252096	FGF12	2.1	-	-	-	
sprouty homolog 2 (Drosophila) (predicted)	BM390457	Spry2	3.2	-	-	-	
numb gene homolog (Drosophila)	BI287975	NUMB	2.0	-1.3	-	-	
neurogenic differentiation 1	NM_019218	NeuroD1	-2.0	-	-	-	
x neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9 (predicted)	BM392374	Nedd9	2.5	-	-	-	[168]
diphtheria toxin receptor	NM_012945	DTR	2.3	-	-	-	
frizzled-related protein (predicted)	BM391538	FRZB	-	-	-	2.1	

Datenvalidierung

Verschiedene Gesichtspunkte machen eine sekundäre Überprüfung von Microarray-Daten unerlässlich. Zum einen können technische Probleme wie z.B. fehlerhafte Amplifikation des Probenmaterials, Kreuzhybridisierungen oder Normalisierungsfehler auftreten. Hinzu kommt, dass es bisher keinen generellen Konsensus zur Datenanalyse gibt. Zum anderen hat auch das experimentelle Design Einfluss auf die Aussagekraft von Chipanalysen. In der vorliegenden Studie wurde mRNA aus Kortexgewebe mehrerer Tiere gepoolt. Neben einem erheblich geringeren Materialaufwand hat das Poolen von Proben auch den Vorteil, die Zuverlässigkeit der identifizierten Kandidatengene zu steigern. Jedoch kann keine Aussage zur inter-individuellen Variabilität getroffen werden [169]. Außerdem kann die Verwendung von Gewebe zu einer Maskierung von Änderungen führen, welche nur in einer kleinen Subpopulation von Zellen auftreten. Nicht zuletzt bleibt eine funktionelle Aussage anhand von Transkriptionsstudien hypothetisch, da Änderungen auf mRNA-Level nicht zwangsläufig mit solchen der entsprechenden Proteine korreliert sind [170].

Zur Prüfung der Validität der Chipdaten wurden Gene aus 8 funktionellen Kategorien ausgewählt und deren Expression mit qRT-PCR und/oder Immunhistochemie analysiert.

Quantitative RT-PCR von gepoolten und Einzelproben

Zunächst wurden qRT-PCR Analysen für 12 Transkripte mit den mRNA-Pools durchgeführt. Für mehr als die Hälfte der Transkripte stimmte die mit qRT-PCR ermittelte Expressionsänderung nahezu exakt mit den Microarraydaten überein (z.B. *TIMP1*, *BDNF*), für andere wurde eine höhere (z.B. *Cox-2*, *EGR1*) oder geringere (z.B. *MCP-1*, *Ntrk2*) Änderung relativ zu den sham-Tieren gemessen, jedoch entsprach die Richtung der Regulation immer der auf den Chips ermittelten. Somit war die Reproduzierbarkeit der Microarray-Daten in den gepoolten RNAs sehr gut (Tabelle 17).

Zur Klärung der Frage, ob die Verwendung gepoolter Proben den individuellen Zustand innerhalb der Gruppe gut widerspiegelt, wurden qRT-PCRs mit den mRNAs von Einzeltieren und 10 gen-spezifischen Primerpaaren durchgeführt (Abb. 11, Tabelle 17). Für *TTR*,

Tabelle 17 qRT-PCR-Daten

Gen	fc MA	fc qRT-PCR Pools	indiv.
3 h			
Cox2	14.9	29.1	35.8
MCP-1	32.0	9.0	-
BDNF	14.9	16.2	19.1
TIMP1	9.2	9.3	7.7
EGR1	3.2	10.9	15.9
Ntrk2	3.0	1.5	1.2
24 h			
CML3	-3.0	-3.0	-4.3
TTR	-2.5	-5.9	-4.8
TIMP1	4.3	3.7	2.0
7 d			
CD74	2.0	2.2	-
TIMP1	8.0	4.9	6.9
Dexas1	-2.0	-1.6	-1.1
30 d			
TTR	5.3	6.0	2.0
Ntrk2	-2.0	-1.4	1.6
ATP1b2	-2.0	-1.4	1.3
Prps2	-2.0	-1.4	1.0

BDNF, *EGR1*, *Cox2*, *DEXRAS1*, *CML3* und *TIMP1* stimmte die Richtung der Regulation mit der anhand der Microarray-Analysen ermittelten überein. Die Streuung der Proben war gering bis moderat, nur für *TTR* gab es nach 30 d eine große interindividuelle Varianz. Die Chip-basierten bzw. auch die aus den qRT-PCR-Analysen der Pools hervorgegangenen Daten konnten insbesondere für die schwach regulierten Gene *ATP1b2*, *Prps2* und *trkB* nicht reproduziert werden. Damit konnten die Microarraydaten mit einer unabhängigen Methode am selben Ausgangsmaterial reproduziert werden, während die Analyse von Individuen eine Reproduzierbarkeit von >70% ergab. Vergleichbare Werte wurden auch in anderen Studien angegeben (Agrawal *et al.*, 2002; Altar *et al.*, 2004).

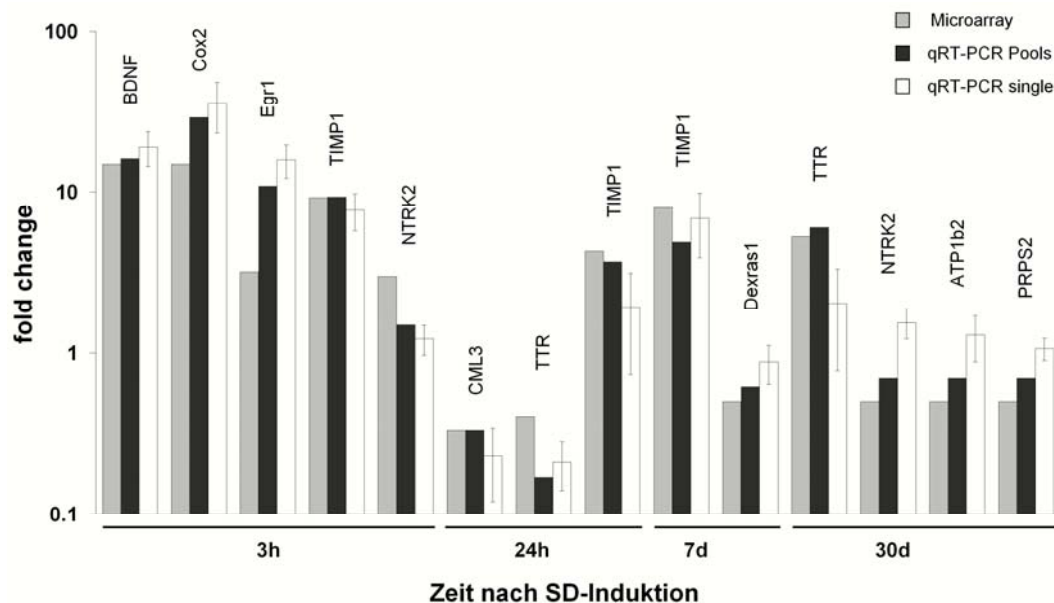


Abb. 11 Validierung der Expressionsdaten ausgewählter Gene in Pools und Einzelproben (single). Die hellgrauen Balken zeigen die mit Microarray ermittelten Änderungen, schwarze und weiße Balken stellen die qRT-PCR-Daten dar, wobei die weißen Balken aus den PCRs der Einzelproben gemittelt wurden. Die Fehlerbalken entsprechen einem Konfidenzintervall von 95%. Die aus den qRT-PCRs von gepoolten Proben resultierenden Daten spiegeln die Microarray-Ergebnisse sehr gut wider, für alle getesteten Gene konnte die Richtung der differentiellen Expression bestätigt werden. Mehr als 70% der Daten konnten mit einer Analyse der Einzeltiere reproduziert werden. Die Berechnung der *fold changes* erfolgte nach Pfaffl [4].

Proteinexpression

Parallel zu den Genexpressionsstudien wurde für 4 der daraus hervorgegangenen Treffer auch die Expression der entsprechenden Proteinprodukte untersucht. Koronale Hirnschnitte von je 3 Tieren pro Gruppe wurden zunächst histochemisch mit der ABC-Methode gefärbt, daran schloss sich eine Phänotypisierung der Zellen mit neuronalen und glialen Markern an.

Ähnlich wie die mRNA, wurden auch das c-Fos-, Cox-2, Stat3- und hsp27 Protein durch SD heraufreguliert. Dabei zeigte c-Fos die schnellste Antwort. Das Protein war bereits nach 3 h sehr stark heraufreguliert (Abb. 12D). Davon war der gesamte ipsilaterale Kortex, aber auch das *stratum granulare* des ipsilateralen Gyrus dentatus betroffen. SD führen zu einer Heraufregulation von c-Fos in allen kortikalen Schichten, wobei die stärkste Expression in den Schichten II/III und IV nachgewiesen wurde. Im kontralateralen Kortex gab es keine Veränderungen, allerdings zeigte ein Tier eine schwache Heraufregulation im kontralateralen Gyrus dentatus. Histologisch besaßen die c-Fos positiven Zellen die Morphologie von Neuronen. Dies konnte durch Mehrfachmarkierungen mit GFAP und NeuN bestätigt werden (Abb. 13A, B).

Die Expression der anderen Proteine zeigte einen deutlich anderen zeitlichen Verlauf als die der Transkripte. Cox-2 blieb im Gegensatz zur mRNA über einen Zeitraum von 7 d heraufreguliert. Die Proteinexpression begann bereits 3 h nach SD, hatte ihr Maximum im Kortex zwischen d1 und d5 und nahm nach einer Woche wieder ab (Abb. 12A). Anders als bei c-Fos fand die Heraufregulation von Cox-2 nur in den oberen ipsilateralen Kortexschichten (II/III) statt. Im Hippocampus wurde Cox-2 nur sehr kurz 24h nach SD induziert, am stärksten im ipsilateralen Gyrus dentatus. Jedoch zeigte sich in allen Tieren auch eine kontralaterale Induktion unterschiedlichen Ausmaßes. Die Mehrfachmarkierung identifizierte die Cox-2 immunreaktiven Zellen als Neuronen (Abb. 13H, I).

Expressionsverlauf und -muster von Stat3 und hsp27 waren ähnlich (Abb. 12B,C). Beide Proteine waren hauptsächlich 3 d nach SD heraufreguliert, jedoch konnten bei starker Vergrößerung auch 5 d nach SD ipsilateral noch Zellen mit erhöhter Immunreaktivität detektiert werden. Dies betraf alle kortikalen Schichten, jedoch bestand eine graduelle Abstufung mit der stärksten Expression in den oberen Schichten. Morphologisch entsprachen die hsp27-positiven Zellen Astrozyten, die Phänotypisierung zeigte eine klare Kolo-kalisation mit GFAP (Abb. 13C-G). Für Stat3 war die Zuordnung zu bestimmten Zelltypen schwieriger, da das Protein nur relativ schwach exprimiert wird. Sicher konnte Stat3 zum einen mit GFAP, aber auch mit NeuN kolo-kalisiert werden (Abb. 13K, L). Dabei exprimierten Astrozyten das Protein sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma, wobei auch die Zellfortsätze immunreaktiv waren (Abb. 13P). Auch in Neuronen war das Protein intranukleär und zytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 13N, Q). Im Gegensatz zu den anderen Proteinen wird Stat3 auch im kontralateralen und sham-Kortex exprimiert, zumeist in Zellen mit neuronaler Morphologie sowohl einigen Astrozyten (Abb. 13M). Keines der untersuchten Proteine konnte mit dem mikroglialen Marker Ox-42 oder mit Oligodendrozyten (O4) kolo-kalisiert werden (Abb. 13G, J, N; z.T. ohne Abbildung).

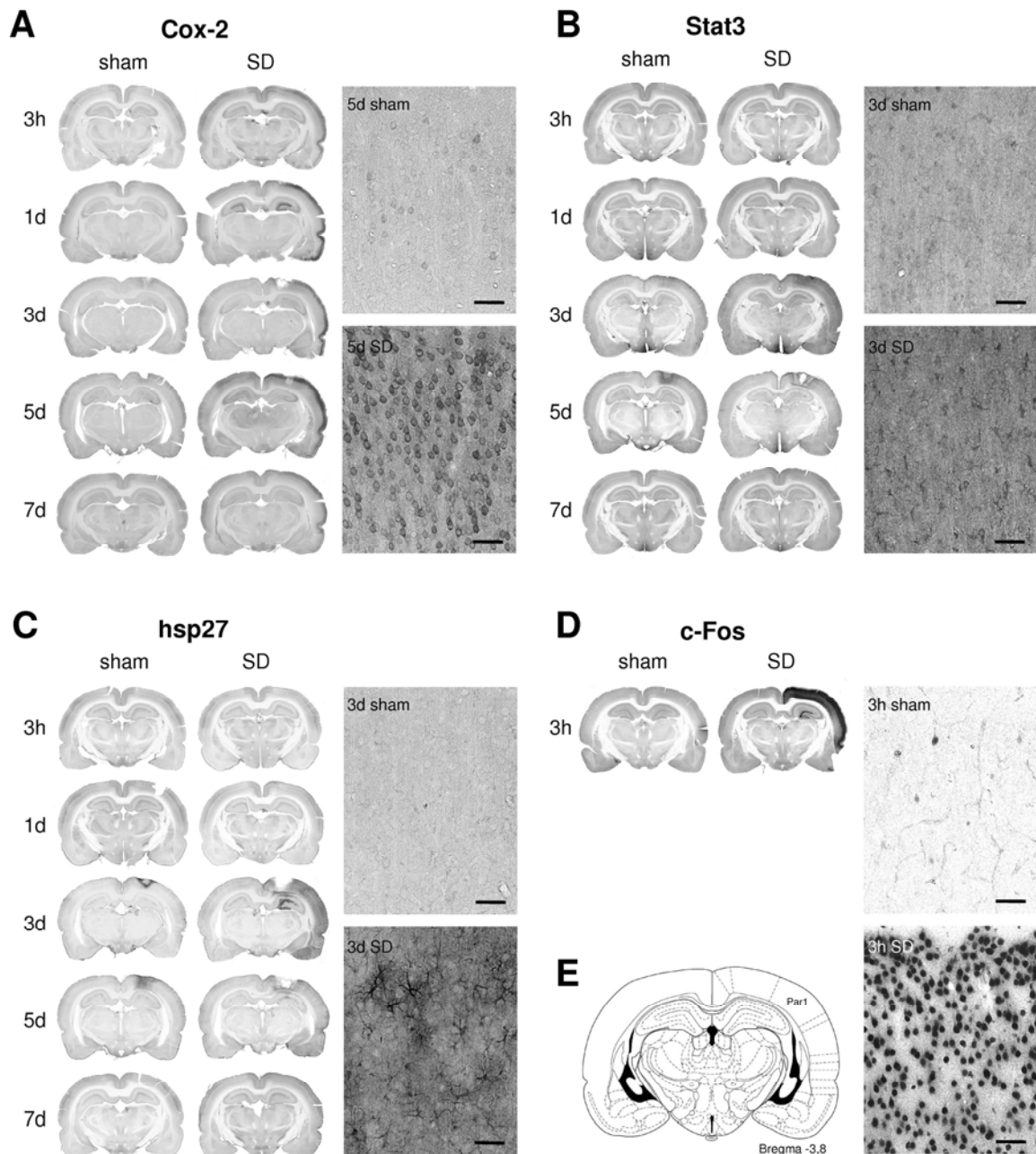


Abb. 12 Expression verschiedener Proteine nach SD. **(A)** Cox-2 Immunhistochemie. Die Expression des Proteins beginnt bereits kurz nach dem Auftreten der SD, bleibt bis zum d5 auf hohem Niveau und fällt zum d7 wieder ab. Die Heraufregulation betraf die oberen Schichten des gesamten ipsilateralen Kortex. SD führten nach 1 d auch zu einer Induktion von Cox-2 im *stratum granulare* des ipsi- wie auch des kontralateralen Gyrus dentatus. Morphologisch entsprachen die Cox-2-immunreaktiven Zellen Neuronen. In sham-Tieren fanden sich nur vereinzelt schwach Cox-2⁺ Zellen. **(B)** Auch die Expression von Stat3 wurde durch SD beeinflusst. Die stärkste Immunreaktivität wurde am d3 detektiert, in geringerem Ausmaß konnten auch am d5 noch Zellen mit erhöhter Stat3-Immunreaktivität identifiziert werden. **(C)** Der Expressionsverlauf von hsp27 ähnelte dem von Stat3, wobei eine leichte Erhöhung der Immunreaktivität auch noch am d7 detektiert wurde. Die Ausschnitte zeigen, dass der Kortex von sham-Tieren absolut keine hsp-27-Immunreaktivität detektierbar war, die hsp27⁺ Zellen in SD-Tieren hatten eine astrozytäre Morphologie. **(D)** c-Fos-IR 3 h nach SD-Induktion. Es kam zu einer starken Erhöhung des Proteins im gesamten ipsilateralen Kortex, wie auch im ipsilateralen Gyrus dentatus. Die Morphologie entsprach der von Neuronen. In sham-Tieren fanden sich nur vereinzelt c-Fos⁺ Zellen. **(E)** Schema eines koronalen Schnittes bei Bregma -3.8 nach Paxinos [171], die 400-fachen Vergrößerungen wurden im Bereich des Par1 aufgenommen. Balken = 50 µm. (Ursache für die unterschiedliche Lokalisation der nekrotischen Läsion ist die Herkunft der Schnitte aus der Genexpressions- (3h, 1d, 7d) und der Neurogenesestudie (3d, 5d), siehe entsprechende Abschnitte.)

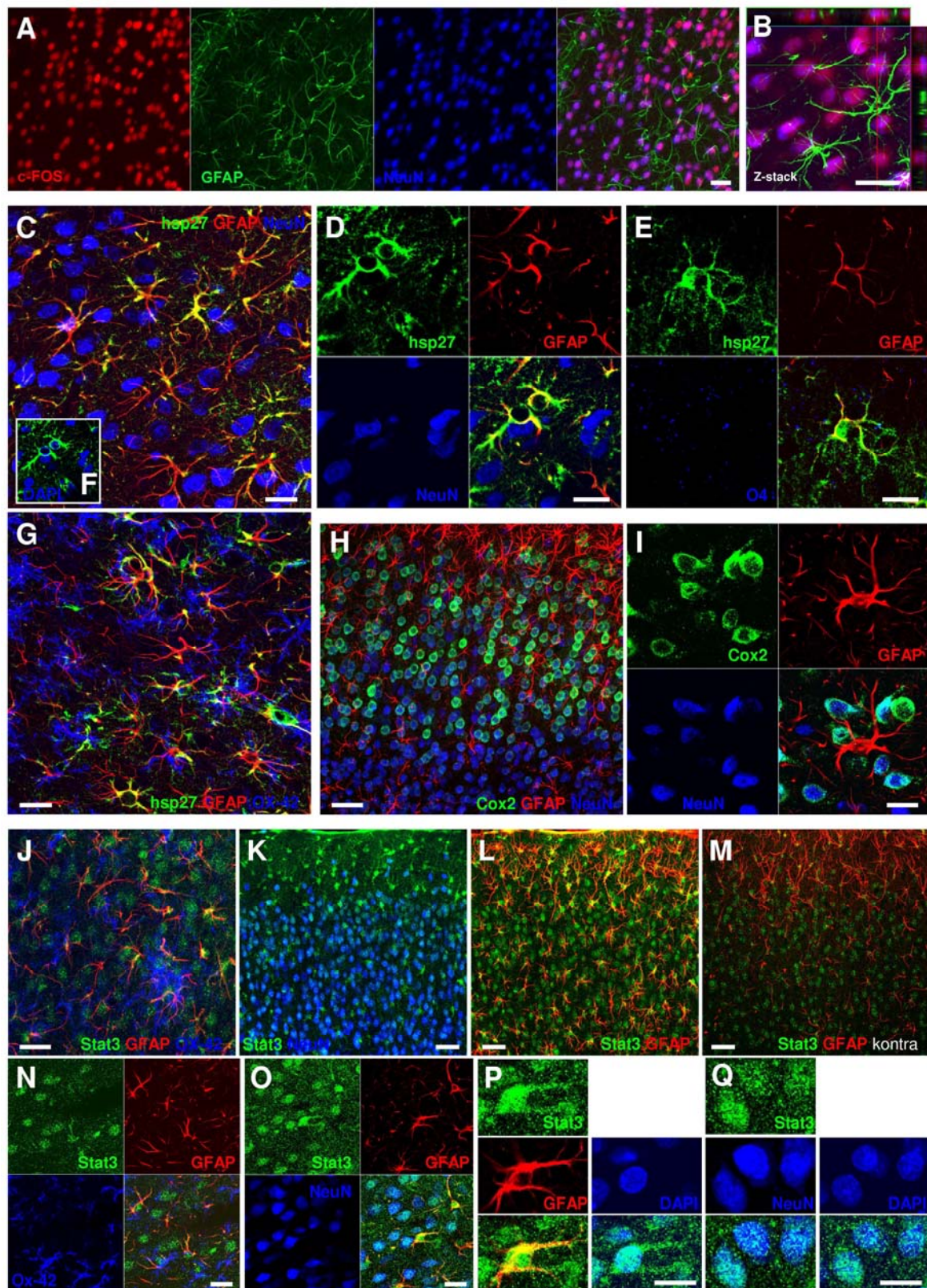


Abb. 13 Phänotypisierung der c-Fos-, hsp27-, Cox2- und Stat3-positiven Zellen im ipsilateralen Par1-Kortex nach SD. **(A, B)** Die Mehrfachmarkierung gegen c-Fos (rot), NeuN (blau) und GFAP (grün) zeigt, dass c-Fos in allen Neuronen exprimiert wird. **(C-F)** Identifizierung der hsp27-positiven Zellen. **(C+D)** Ausschnitte eines mit Antikörpern gegen hsp27 (grün), NeuN (blau) und GFAP (rot) gefärbten Schnittes. Hsp27 wird nach SD im Zytoplasma von Astrozyten heraufreguliert, auch die Ausläufer der Zellen sind hsp27⁺. Eine Kolokalisation mit NeuN oder O4 **(E)** konnte nicht nachgewiesen werden. Die Doppelmarkierung gegen hsp27 und DAPI in Abbildung **(F)** verdeutlicht, dass hsp27 außerhalb der Zellkerne exprimiert wird. **(H-I)** Mehrfachmarkierung gegen Cox2 (grün), NeuN (blau) und GFAP (rot). Cox2 wird hauptsächlich im Perikaryon von Neuronen der oberen

Korterschichten heraufreguliert. (J-Q) Phänotypisierung der Stat3-positiven Zellen. (J+N) Antikörpermarkierung gegen Stat3 (grün), Ox-42 (blau) und GFAP (rot). Stat3 wurde im Kern, aber auch in den Fortsätzen von GFAP-positiven Astrozyten nachgewiesen. Es gab keine Kolokalisation mit dem mikroglialen Marker Ox-42. (K+O) Stat3 wurde nach SD auch im Zellkern und Perikaryon von Neuronen exprimiert. (L) Übersicht über die Stat3/GFAP-Kolokalisation im ipsilateralen Kortex nach SD. (K) zeigt das Basisniveau von Stat3 im kontralateralen Kortex. Die Expression ist geringer als ipsilateral, einige Astrozyten und hauptsächlich Zellen mit neuronaler Morphologie sind Stat3⁺. Die Abbildungen (P+Q) zeigen eine starke Vergrößerung von Stat3-positiven Astrozyten und Neuronen. Beide Abbildungen zeigen zusätzlich eine Kernfärbung (DAPI). Balken: (A-G, I, P, Q) 20 µm, (J, N-O) 30 µm, (H, K-L) 50 µm.

Projekt 2: Neurogenesestudie

Um einen möglichen Effekt von kortikalen SD auf die hippocampale Neurogenese und damit einen möglichen Zusammenhang zur Neurogenese nach Schlaganfall nachzuweisen, wurden mehrere Experimente durchgeführt. SD-, photothrombotisch infarzierten (PT)- und den jeweiligen Kontrollratten wurde zu verschiedenen Zeitpunkten BrdU injiziert, um mitotisch aktive Stamm- und Vorläuferzellen bzw. deren Nachkommen zu markieren. Anzahl und Phänotyp der BrdU⁺ Zellen wurde dann nach unterschiedlichen Überlebenszeiten analysiert (Abb. 7).

Kortikale SD steigern die Anzahl neugeborener Zellen im adulten Gyrus dentatus

SD verursachten eine massive Induktion der proliferativen Aktivität im Gyrus dentatus adulter Ratten (Tabelle 18 + Abb. 15). Die immunhistochemische Färbung koronaler Schnitte von Tieren, die 3 BrdU-Injektionen am d2 erhielten und bis zum d3 überlebten, identifizierte etwa 270 % mehr BrdU⁺ Zellkerne im ipsilateralen Gyrus dentatus relativ zu den Kontrollen ($p = 0.016$). Tendenziell steigerte sich die proliferative Aktivität noch zum d4 (n.s.). Zu diesem Zeitpunkt übertraf die ipsilaterale Proliferation von SD-Tieren die der Kontrollen um ca. 470% (evaluiert am d5; $p = 0.01$). Nahezu alle BrdU⁺ Zellkerne waren unregelmäßig geformt und lagen in Clustern in der Subgranulärzone. Diese Cluster waren zahlreicher und größer im ipsilateralen Gyrus dentatus von SD-Tieren verglichen zum kontralateralen oder zum Gyrus dentatus von sham-Tieren (Abb. 14).

Eine weitere Gruppe von Ratten erhielt in der ersten Woche nach SD bzw. sham-Behandlung alle 12 h eine BrdU-Injektion. 5 Wochen später hatten SD-Tiere signifikant mehr BrdU⁺ Zellen im ipsilateralen Kortex als Kontrolltiere (280 %; $p = 0.003$). Die BrdU-markierten Zellkerne waren nun voneinander separiert über das *Stratum subgranuläre* und die innere Schicht des *Stratum granulare* verteilt. Ihre große, runde Morphologie entsprach der von Körnerzellen.

Alle SD-Gruppen zeigten eine signifikant höhere Anzahl BrdU⁺ Zellen im ipsilateralen relativ zum kontralateralen Gyrus dentatus (d3: $p = 0.031$; d5: $p = 0.016$; d42: $p = 0.002$; Tabelle 18, Abb. 15). Ebenso fanden sich zu allen Untersuchungszeitpunkten mehr BrdU⁺ Zellen im kontralateralen Gyrus dentatus von SD Tieren verglichen mit den Kontrollen. Diese Differenz war jedoch nicht signifikant.

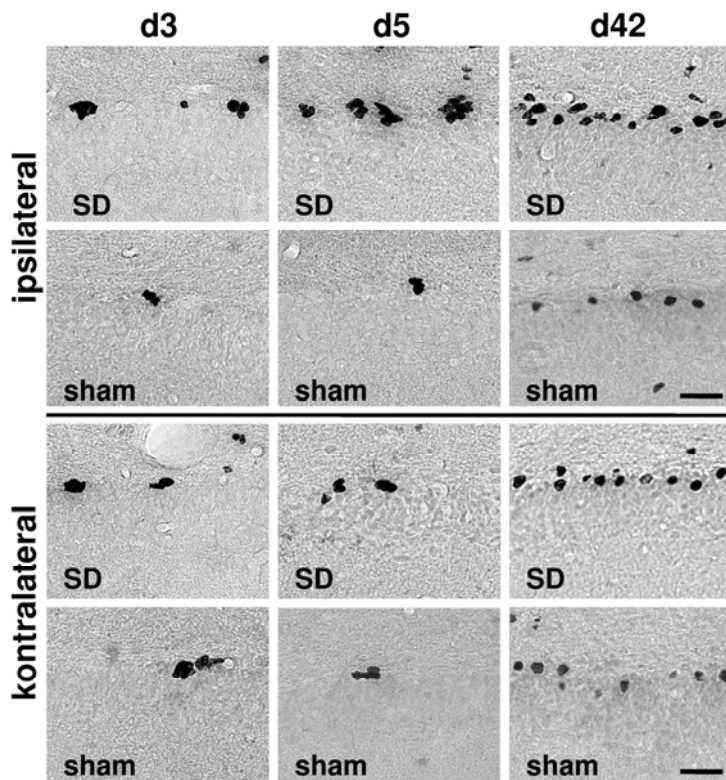


Abb. 14 Verteilung BrdU⁺ Zellen im adulten Gyrus dentatus nach SD und sham-Eingriff. Koronale Schnitte wurden immunhistochemisch gegen den Proliferationsmarker BrdU gefärbt (ABC Methode). SD Tiere zeigten eine erhöhte Anzahl BrdU-markierter Zellen im Vergleich zu sham-Tieren. Zu den frühen Untersuchungszeitpunkten lagen die BrdU⁺ Zellen als Cluster in der Sugranulärzone. 6 Wochen später hatten sich diese Zellen voneinander separiert, viele waren in die innere Zone des *Stratum granulare* eingewandert. Morphologisch waren die Zellen nun nicht mehr von Körnerzellen zu unterscheiden. Balken = 20 µm.

Um auszuschließen, dass der im ipsilateralen Gyrus dentatus beobachtete proliferative Effekt direkt durch Diffusion des KCl in den Hippocampus verursacht wurde, wurden zwei zusätzliche experimentelle Gruppen eingeschlossen. Eine Gruppe erhielt 45 min vor Erstapplikation des 3 M KCl den NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 i.p. verabreicht. Verschiedene Studien belegen, dass MK-801 SD inhibiert [28, 172]. Die BrdU-Injektionen erfolgten am d2 nach den Eingriffen, die BrdU-Inkorporation wurde am folgenden Tag analysiert. In 2 der 4 Ratten wurden die SD durch MK-801 vollständig unterdrückt, ein Tier zeigte eine minimale DC-Deflektion und ein Tier eine SD normaler Amplitude direkt nach Applikation des KCl. In allen Tieren wurden gleich viele BrdU⁺ Zellen im ipsi- wie im kontralateralen Gyrus dentatus nachgewiesen. Die Absolutzahl der Zellen, die BrdU inkorporiert hatten, war signifikant geringer als in SD-Tieren ($p = 0.032$) und entsprach in etwa der in den sham-operierten Kontrollen (Abb. 15B, Tabelle 18).

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass das auf den Kortex applizierte 3 M KCl eventuell hippocampale SD auslöst (durch Diffusion des KCl in den Hippocampus), wurde in einer Gruppe von 4 Ratten auch das hippocampale DC-Potential abgegriffen. Über einen Zeitraum von 3 h, wobei während der ersten 2 h 3 M KCl auf den okzipitalen Kortex appliziert wurde, konnten in keinem der Tiere SD im Hippocampus registriert werden (Abb. 16). Außerdem gaben die histologischen Färbungen keinerlei Hinweise auf Zellveränderungen im Hippocampus.

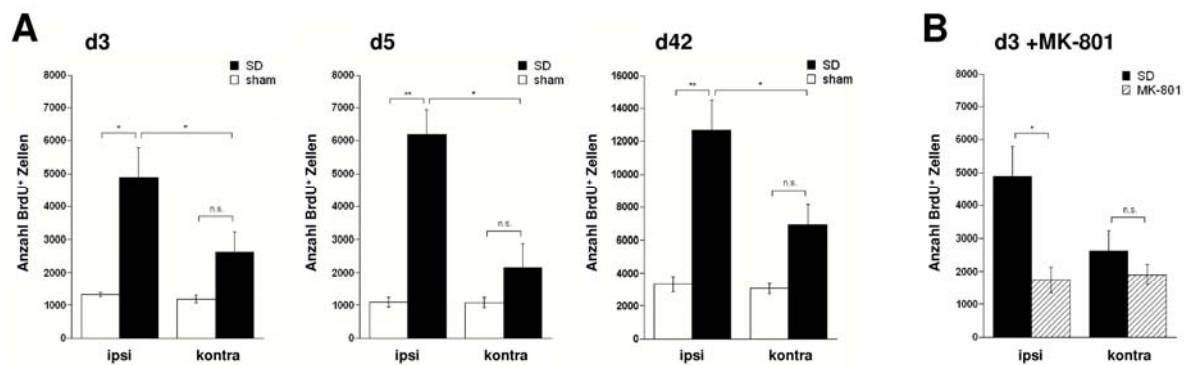


Abb. 15 SD steigert die Anzahl BrdU⁺ Zellen im ipsilateralen Gyrus dentatus adulter Ratten. **(A)** BrdU⁺ Zellen im ipsi- und kontralateralen Gyrus dentatus 3, 5 und 42 Tage postoperativ. Die Tiere erhielten entweder 3 BrdU-Injektionen am d2 oder d4 und überlebten jeweils bis zum folgenden Tag oder sie wurden für eine Woche 2 mal täglich mit BrdU gespritzt und überlebten für weitere 5 Wochen. Zu allen Untersuchungszeitpunkten wurden signifikant mehr BrdU⁺ Zellen im ipsilateralen Gyrus dentatus von SD-Tieren nachgewiesen. SD beeinflusste auch die Neurogenese im kontralateralen Gyrus dentatus, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant. **(B)** Eine Gruppe von Ratten erhielt MK-801 i.p. vor Applikation des KCl. Die Substanz unterdrückte den proliferativen Effekt, welcher in den anderen Gruppen nach KCl-Applikation auftrat. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, n.s. = nicht signifikant.

Tabelle 18 Absolute Anzahl BrdU⁺ Zellen und prozentualer Anteil neuronaler Vorläuferzellen (DCX⁺), Astrozyten (GFAP⁺, S100 β ⁺) und adulter Neurone (NeuN⁺) im Gyrus dentatus. MK-801 = mit MK-801 vorbehandelte KCl-Tiere. Signifikanzen: $p \leq 0.05$ relativ zu sham* und relativ zu kontralateral^s.

		Tag 3		Tag 5		Tag 42	
		ipsilateral MW \pm SEM	kontralateral MW \pm SEM	ipsilateral MW \pm SEM	kontralateral MW \pm SEM	ipsilateral MW \pm SEM	kontralateral MW \pm SEM
SD		(n=5)		(n=6)		(n=9)	
	BrdU ⁺ abs.	4893.6 \pm 912.4 ^s	2635.2 \pm 596.5	6182.0 \pm 751.3 ^s	2152.0 \pm 730.8	12692.7 \pm 1815.5 ^s	6910.7 \pm 1241.5
	DCX ⁺ (%)	78.8 \pm 2.1	78.4 \pm 1.7	87.0 \pm 2.3	85.7 \pm 2.9	0.4 \pm 0.3	0.9 \pm 0.5
	S100 β ⁺ (%)	1.6 \pm 0.7	1.6 \pm 0.7	1.0 \pm 0.7	1.3 \pm 0.7	3.1 \pm 0.8	2.4 \pm 0.4
	NeuN ⁺ (%)	--- \pm ---	--- \pm ---	--- \pm ---	--- \pm ---	90.0 \pm 1.1 [*]	84.9 \pm 1.3
	GFAP ⁺ (%)	--- \pm ---	--- \pm ---	--- \pm ---	--- \pm ---	1.7 \pm 0.7	2.0 \pm 0.5
sham		(n=4)		(n=4)		(n=4)	
	BrdU ⁺ abs.	1323.0 \pm 69.7	1180.5 \pm 119.1	1092.0 \pm 148.8	1077.0 \pm 168.1	3333.0 \pm 471.6	3063.0 \pm 311.9
	DCX ⁺ (%)	80.5 \pm 3.5	83.8 \pm 2.0	88.0 \pm 0.8	84.7 \pm 3.2	2.5 \pm 0.5	1.5 \pm 1.0
	S100 β ⁺ (%)	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.5 \pm 1.0	2.5 \pm 1.9	2.5 \pm 0.5	3.0 \pm 0.6
	NeuN ⁺ (%)	--- \pm ---	--- \pm ---	--- \pm ---	--- \pm ---	85.0 \pm 0.6	85.0 \pm 1.9
	GFAP ⁺ (%)	--- \pm ---	--- \pm ---	--- \pm ---	--- \pm ---	2.0 \pm 0.8	2.5 \pm 1.3
MK-801	BrdU ⁺ abs.	(n=4)					
		1743.0 \pm 388.4	1908.0 \pm 305.6				

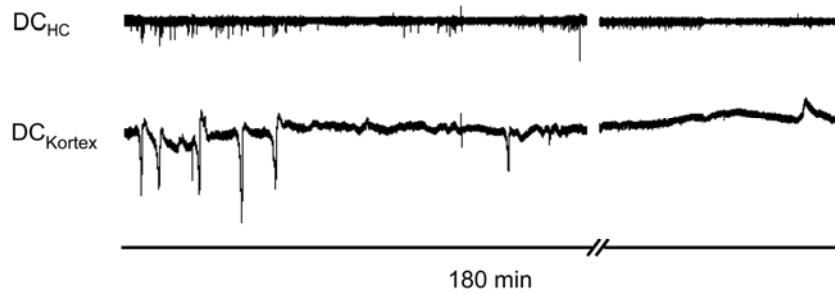


Abb. 16 DC-Potentialaufzeichnung im Hippocampus (DC_{HC}) und vom Kortex (DC_{Kortex}) während 2-stündiger KCl-Applikation auf den occipitalen Kortex plus eine Stunde darüber hinaus.

Kortikale SD steigern die Neuroneogenese im adulten Gyrus dentatus

Zur Bestimmung der Phänotypen der $BrdU^+$ Zellen wurden Mehrfachimmunmarkierungen mit Antikörpern gegen $BrdU$ in Kombination mit DCX , $NeuN$, $GFAP$ oder $S100\beta$ durchgeführt (Abb. 17B-D). Unmittelbar nach $BrdU$ -Injektionen, am d3 oder d5, exprimierten etwa 80% der $BrdU^+$ Zellen den Marker neuronaler Vorläuferzellen DCX (Abb. 17B, F; Tabelle 18). Diese Beobachtung traf beidseitig, sowohl für SD- als auch sham-Tiere zu, d.h. SD hatte keinen Einfluss auf die Differenzierung der Vorläuferzellen in DCX -positive Neuroblasten. Nach 42 d exprimierten weniger als 1 % der neu gebildeten Zellen DCX (Abb. 17D, F; Tabelle 18). Stattdessen zeigte die Doppelmarkierung mit $NeuN$ -Antikörpern, dass mindestens 85 % der $BrdU^+$ Zellen zu reifen Neuronen differenziert waren (Abb. 17C, G). Dabei übertraf der Prozentsatz $BrdU^+/NeuN^+$ Zellen im ipsilateralen Gyrus dentatus von SD-Tieren den der Kontrollen um 5% ($p = 0.034$). Dies deutet darauf hin, dass SD entweder die neuronale Differenzierung oder das Überleben von Neuronen selektiv beeinflussen. Bezogen auf die Absolutzahl $BrdU^+$ Zellen im ipsilateralen Gyrus dentatus kam es zu einem signifikanten Anstieg neuronaler Vorläuferzellen am d3 (270 %, $p = 0.016$) und d5 (462 %, $p = 0.01$) und adulter Neurone nach 6 Wochen (305 %, $p = 0.003$; Abb. 17F, G). Die neu entstandenen Neurone ließen sich morphologisch nicht von den Körnerzellen des Gyrus dentatus unterscheiden.

Nur wenige der $BrdU^+$ Zellen besaßen einen astrozytären Phänotyp (Tabelle 18; Abb. 17B, C). Es gab keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil oder der absoluten Anzahl $BrdU^+/GFAP^+$ bzw. $BrdU^+/S100\beta^+$ Zellen zwischen ipsi- und kontralateralem Gyrus dentatus der SD-Tiere und im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollen.

Um auszuschließen, dass es nach SD zu einer vermehrten apoptotischen Eliminierung von neu gebildeten oder bestehenden Neuronen kam, wurden Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen $BrdU$ und aktive Caspase-3 durchgeführt (Abb. 17E). Weder unmittelbar nach dem Auftreten von SD

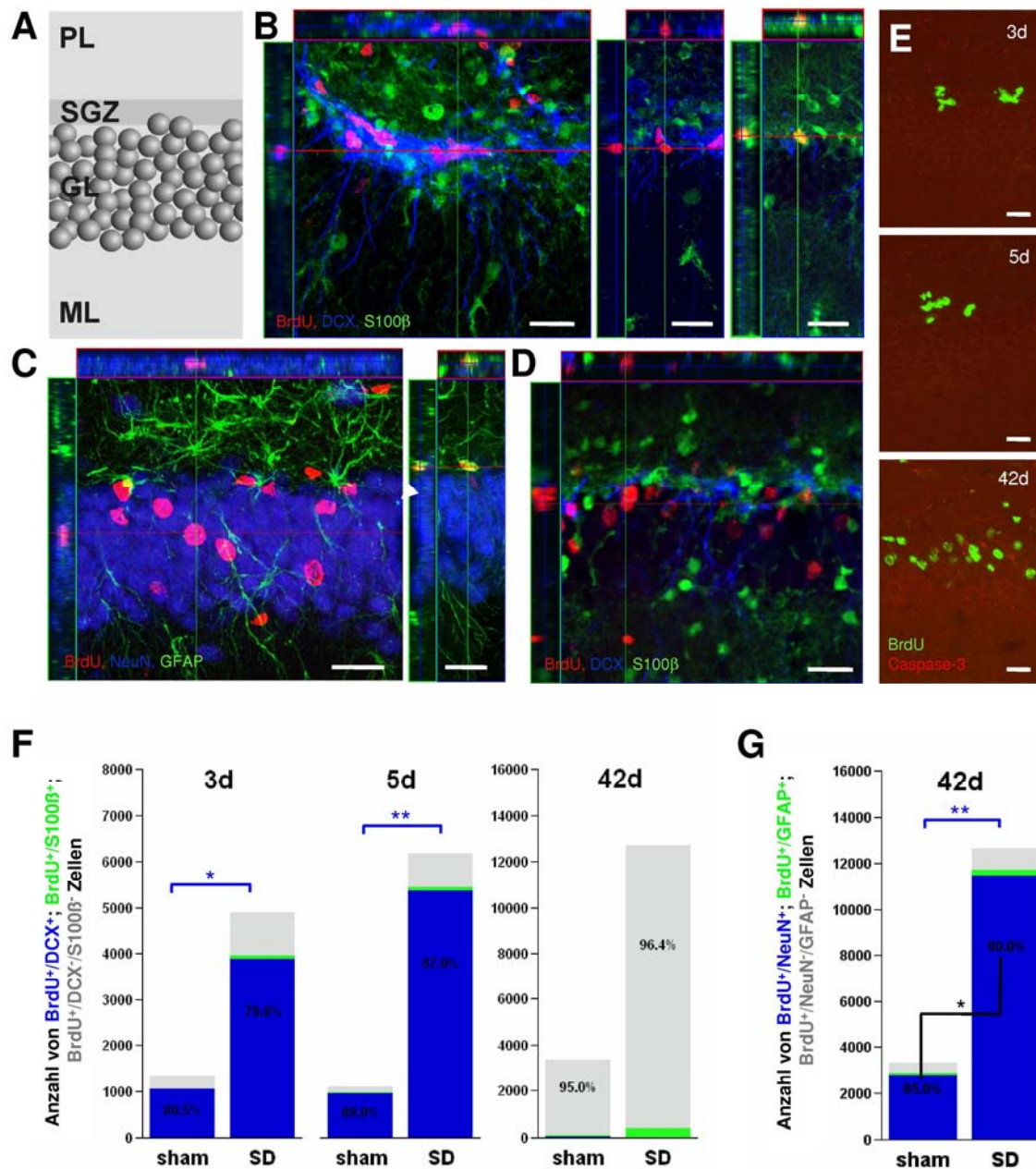


Abb. 17 Phänotypisierung der BrdU⁺ Zellen. **(A)** Schematische Darstellung der Zytoarchitektur des Gyrus dentatus (ML – stratum moleculare, SGZ – stratum subgranulare, GL – stratum granulare; PL – stratum multiforme). **(B)** Dreifachmarkierung gegen BrdU (rot), DCX (blau) und S100β (grün) am d3. Das erste Foto zeigt BrdU⁺/DCX⁺ neuronale Vorläuferzellen, das zweite eine BrdU⁺ Zelle mit unklarem Phänotyp und das dritte eine BrdU⁺/S100β⁺ Gliazelle. **(C)** Immunfluoreszenz mit Markern gegen BrdU (rot), NeuN (blau) und GFAP (grün) nach 42 d. Die erste Abb. zeigt mehrere BrdU⁺/NeuN⁺ Neurone, die zweite einen BrdU⁺/GFAP⁺ Astrozyten. **(D)** Mehrfachmarkierung gegen BrdU (rot), DCX (blau) und S100β (grün) 42 d nach SD. **(E)** Zu keinem Zeitpunkt wurden Hinweise auf eine vermehrte Apoptose nach SD detektiert. Die Schnitte wurden mit Antikörpern gegen BrdU (grün) und aktivierte Caspase-3 (rot) gefärbt. **(F)** Quantifizierung der BrdU⁺ neuronalen Vorläufer und astrozytärer Zellen. Die meisten BrdU⁺ Zellen entsprachen zu den frühen Untersuchungszeitpunkten DCX⁺ neuronalen Vorläuferzellen. Nach 42 d wurden kaum noch BrdU⁺/DCX⁺ Zellen nachgewiesen, während die NeuN-Expression auf etwa 90% angestiegen ist **(G)**. Im Gyrus dentatus von SD-Ratten entstanden signifikant mehr neue Neuronen als in dem von sham-Tieren, die Differenzierung der neuen Zellen war um 5% zugunsten eines neuronalen Phänotyps verschoben ($p \leq 0.05^*$ or $p \leq 0.01^{**}$).

noch 6 Wochen später konnte eine Aktivierung der Caspase-3 im Gyrus dentatus nachgewiesen werden. Ebenso zeigten die Kontrollen keinerlei Caspase-3-IR. Stark aktive Caspase-3 immunreaktive

Zellen befanden sich ausschließlich in den Läsionen von 42d Tieren.

Hippocampale Neurogenese nach kortikalen photothrombotischen Infarkten

Ischämische Infarkte wurden photothrombotisch nach Watson *et al.* [150] induziert. Die Läsionen durchspannten alle kortikalen Schichten, das *Corpus callosum* war unbeeinträchtigt (Abb. 19). Die Einteilung der Untersuchungsgruppen und BrdU-Applikation erfolgte analog den SD-Versuchen (Abb. 7). Die Resultate der immunhistochemischen Analyse sind in Abb. 18 gezeigt. Am d3 waren sowohl in infarzierten (PT-) als auch in scheinoperierten Tieren ca. 1500 Zellen/Gyrus dentatus BrdU-positiv. Zwei Tage später war die Anzahl BrdU⁺ Zellen im ipsilateralen Gyrus dentatus von PT-Ratten leicht erhöht (32 %; $p = 0.016$), während sich der kontralaterale Gyrus dentatus der PT-Tiere nicht vom ipsi- oder kontralateralen Gyrus dentatus von sham-Tieren unterschied. Dieser Effekt setzte sich jedoch langfristig nicht durch, denn am d42 zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen infarzierten und scheinoperierten Tieren (jeweils etwa 3700 BrdU⁺ Zellen/Gyrus dentatus).

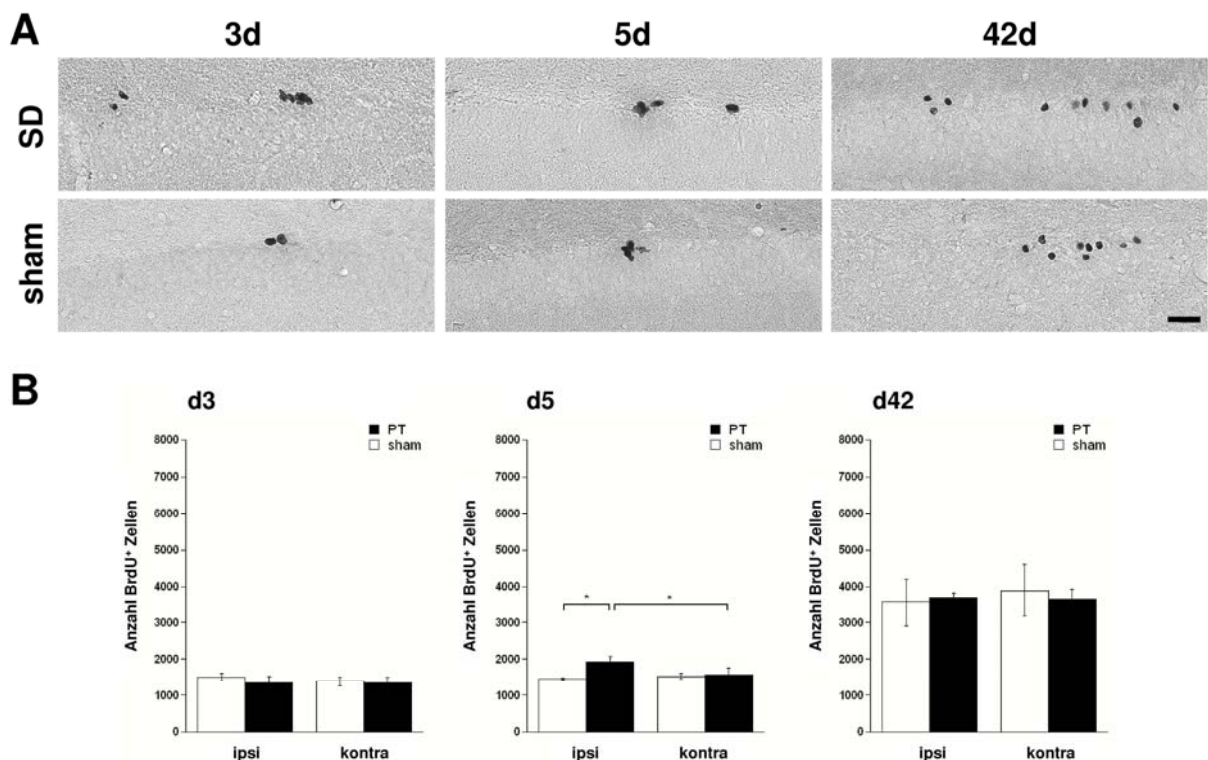


Abb. 18 BrdU-Inkorporation im Gyrus dentatus nach photothrombotischen Infarkten. **(A)** Immunhistochemische Darstellung von BrdU⁺ Zellen im ipsilateralen Gyrus dentatus zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach PT. Am d3 und d5, jeweils einen Tag nach BrdU-Injektion, lagen die BrdU⁺ Zellkerne in Clustern im *Stratum subgranulare*. 6 Wochen nach dem Infarkt befanden sich die nun abgerundeten Zellkerne zerstreut hauptsächlich in der inneren Schicht des *stratum granulare* (Balken = 20 μ m). **(B)** Quantifizierung. Der Infarkt führte zu einer leichten Induktion der Proliferation am d2 (detektiert am d3), während die Anzahl neu gebildeter Zellen im Gyrus dentatus von PT-Tieren zu den anderen Untersuchungszeitpunkten der der entsprechenden Kontrollen entsprach (MW \pm SEM; * $p \leq 0.05$).

Volumetrische Analyse

In allen Untersuchungsgruppen wurde das Volumen der kortikalen Läsionen ermittelt (Tabelle 19, Abb. 19). Dazu wurde zunächst die Fläche der Läsionen an Kresylviolett-gefärbten Schnitten (jeder 6.) bestimmt, eine Abschätzung des Volumens erfolgte dann durch Integration der Flächensumme über die Schnittdicke und Anzahl der Schnitte. Die Volumina der durch 3 M NaCl hervorgerufenen Läsionen (SD-sham) waren im Durchschnitt kleiner als die der KCl-Läsionen (SD). Am postoperativen d3 gab es keine signifikanten Volumenunterschiede der KCl-, KCl+MK-801- und photothrombotischen Läsionen (PT). In der Folgezeit kam es zu einer sukzessiven Verkleinerung aller Läsionen. Dies war bei den PT am stärksten ausgeprägt (ca. 75 % zwischen d3 und d42), bereits nach 5 Tagen erreichten die Infarkte die Größe der NaCl-Läsionen. Die KCl-Läsionen hingegen schrumpften etwas weniger (in 42 Tagen ca. 45 %), ihr Volumen überstieg damit zu allen Zeitpunkten das der anderen Läsionen.

	Tag 3	Tag 5	Tag 42
	MW \pm SEM	MW \pm SEM	MW \pm SEM
SD	8.46 \pm 0.65	6.47 \pm 0.32	4.51 \pm 0.33
SD-sham	3.36 \pm 1.14	3.73 \pm 0.76	1.96 \pm 0.26
SD + MK-801	6.73 \pm 1.54	--- \pm ---	--- \pm ---
PT	6.75 \pm 0.72	3.53 \pm 0.39	1.56 \pm 0.17

Tabelle 19 Volumen der durch die Applikation von 3 M KCl (SD), 3 M NaCl (SD-sham) resultierenden und von photothrombotischen (PT) Läsionen in mm³.

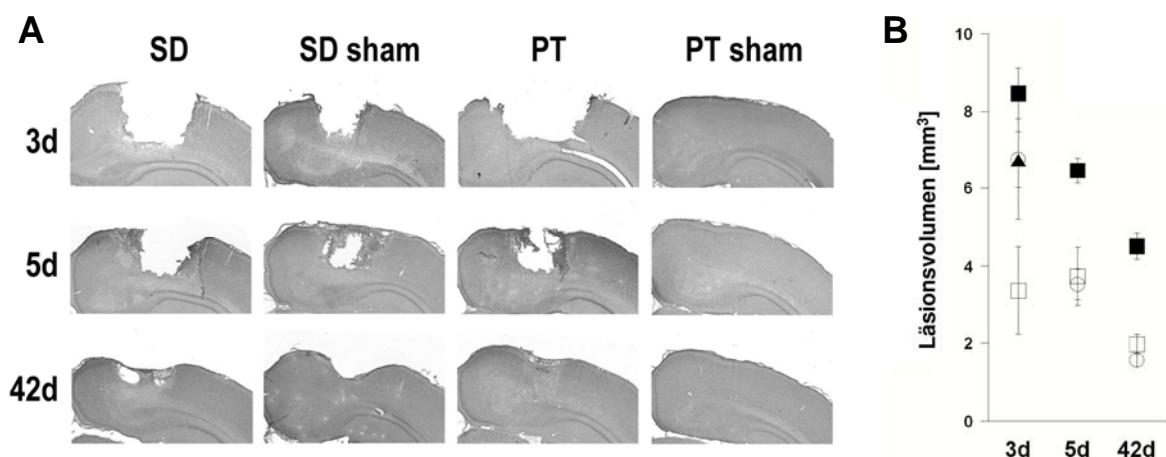


Abb.19 Analyse der Salzapplikationsstellen und photothrombotischen Infarkte. (A) Histologische Färbung (Kresylviolet) von koronalen Hirnschnitten (Bregma -4.8 bis 5.3). Die Applikation der hyperosmolaren Salzlösungen führte ähnlich wie die Infarktinduktion zu kleinen kortikalen Läsionen. Die volumetrische Analyse in (B) zeigte, dass sich die Läsionen abhängig von der Art ihrer Verursachung unterschiedlich entwickeln. Die KCl-Tiere hatten grundsätzlich die größten Läsionen, wobei die Infarkte am Tag 3 ein ähnliches Volumen erreichten. Dieses verringerte sich über die Zeit stärker als das der KCl-Läsionen. Die durch NaCl verursachten Läsionen verkleinerten sich in den 42 Tagen nur geringfügig. Jeder 6. Schnitt wurde zur Auswertung herangezogen, wobei zunächst der Flächeninhalt der Läsionen in jedem Schnitt ermittelt wurde. Anschließend wurde die Summe der Flächen pro Hirn ermittelt und mit 240 μ m multipliziert (6 x 40 μ m). ■ = SD, □ = SD-sham, ▲ = SD+MK-801, ○ = PT; angegeben sind MW \pm SEM.

Korrelation des histologischen Schadens im zerebralen Kortex mit der Neurogenese-rate im Gyrus dentatus

Da SD-Tiere zu jedem Untersuchungszeitpunkt größere kortikale Läsionen aufwiesen als die entsprechenden Kontrollen, stellte sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der Größe der Läsion und der Anzahl der neu gebildeten Zellen existiert. Zur Klärung dieser Frage wurden die ermittelten Läsionsvolumina graphisch gegen die Anzahl BrdU⁺ Zellen in den entsprechenden Gruppen aufgetragen, zusätzlich wurde für jeden Untersuchungszeitpunkt eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt (Abb. 20A). Die aus den Bestimmtheitsmaßen (R^2) errechneten Korrelationskoeffizienten (r) ließen eine positive Korrelation zwischen Neurogenese-rate und

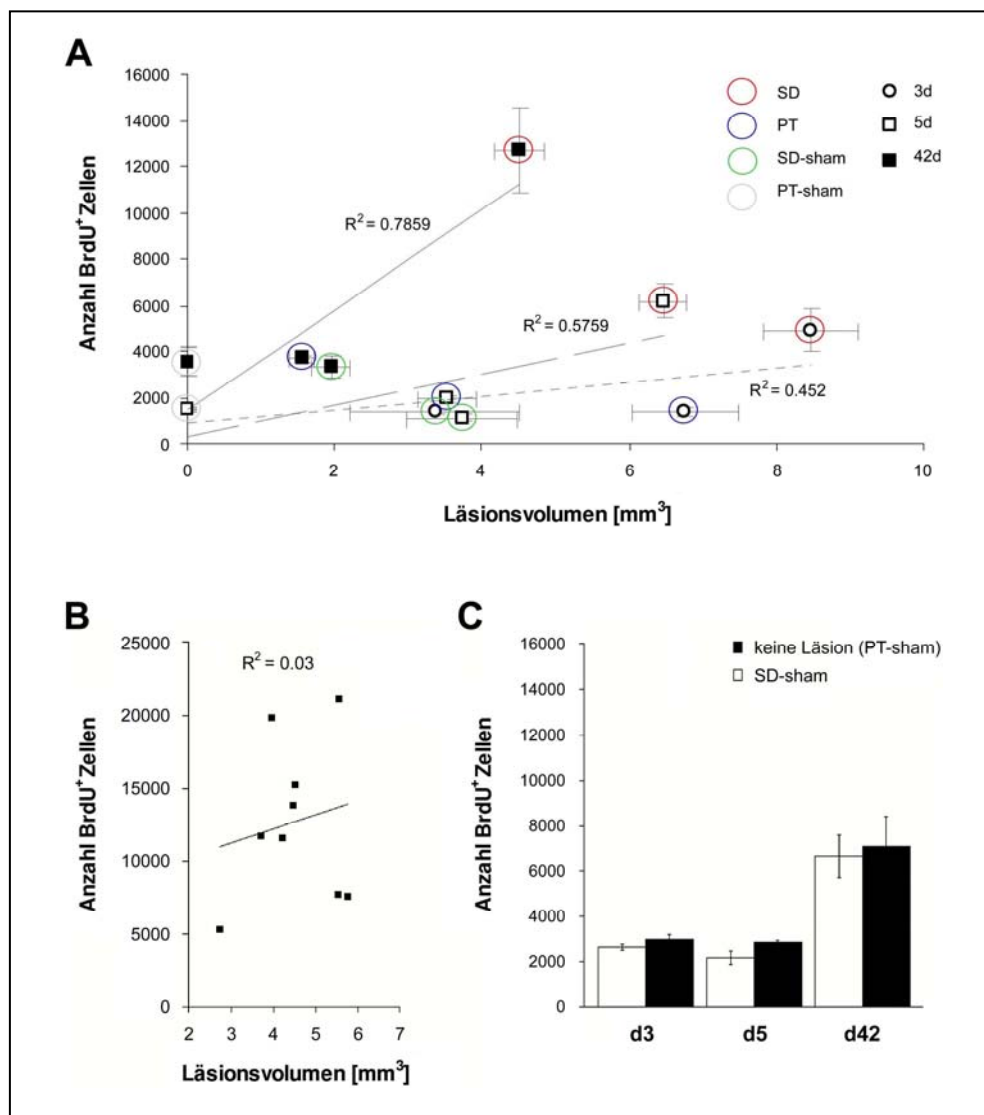


Abb. 20 Hippocampale Neurogenese und Läsionsgröße. **(A)** Graphische Gegenüberstellung der Läsionsvolumina und BrdU⁺ Zellen im ipsilateralen Gyrus dentatus (alle Untersuchungsgruppen). Die Abbildung verdeutlicht, dass im Gyrus dentatus von NaCl-, PT- und PT-sham-Tieren unabhängig von der Größe des kortikalen Schadens etwa gleich viele Zellen BrdU inkorporiert hatten. Nur in SD-Tieren wurde eine erhöhte Neurogeneserate detektiert, KCl verursachte jedoch auch die größten Läsionen. Abbildung **(B)** zeigt exemplarisch das Verhältnis von Läsionsgröße und Neurogenese in der SD-Gruppe am d42 (n = 9). Die beiden Variablen sind nicht miteinander korreliert. In **(C)** ist der BrdU-Einbau im Gyrus dentatus unläsionierter (PT-sham) und läsionierter (SD-sham) Tiere dargestellt. Es gibt keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Läsionsvolumen vermuten ($r_{d3} = 0.65$; $r_{d5} = 0.76$; $r_{d42} = 0.88$). Dagegen sprechen jedoch mehrere Punkte: Beispielsweise gab es kaum Unterschiede (am d5) in der Neurogeneserate von SD-sham (3 M NaCl) und PT-sham Tieren (Abb. 20C), obwohl der Kortex der ersten Gruppe läsioniert, der der zweiten aber intakt war. Desweiteren waren die Läsionen von SD- und PT-Tieren am d3 etwa gleich groß, während ein signifikanter Anstieg BrdU⁺ Zellen nur in der SD-Gruppe beobachtet wurde. Auch im Vergleich der Einzeltiere innerhalb der SD-Gruppe am d42 konnte keinerlei Korrelation von Läsionsvolumina und BrdU-Absolutzahlen im ipsilateralen Gyrus dentatus detektiert werden (Abb. 20B).

Es lässt sich schlussfolgern, dass es keinen nachweisbaren Zusammenhang zwischen der Größe einer kortikalen Läsion (des okzipitalen Kortex) und der Bildung neuer Nervenzellen im Gyrus dentatus gibt. Die erhöhte Neurogeneserate in den SD-Gruppen basiert einzig auf dem Auftreten der kortikalen SD. Darüber hinaus deuten die Daten darauf hin, dass kleine kortikale Läsionen keinen Einfluss auf die hippocampale Neurogenese haben.

Projekt 3: Verhaltenstests

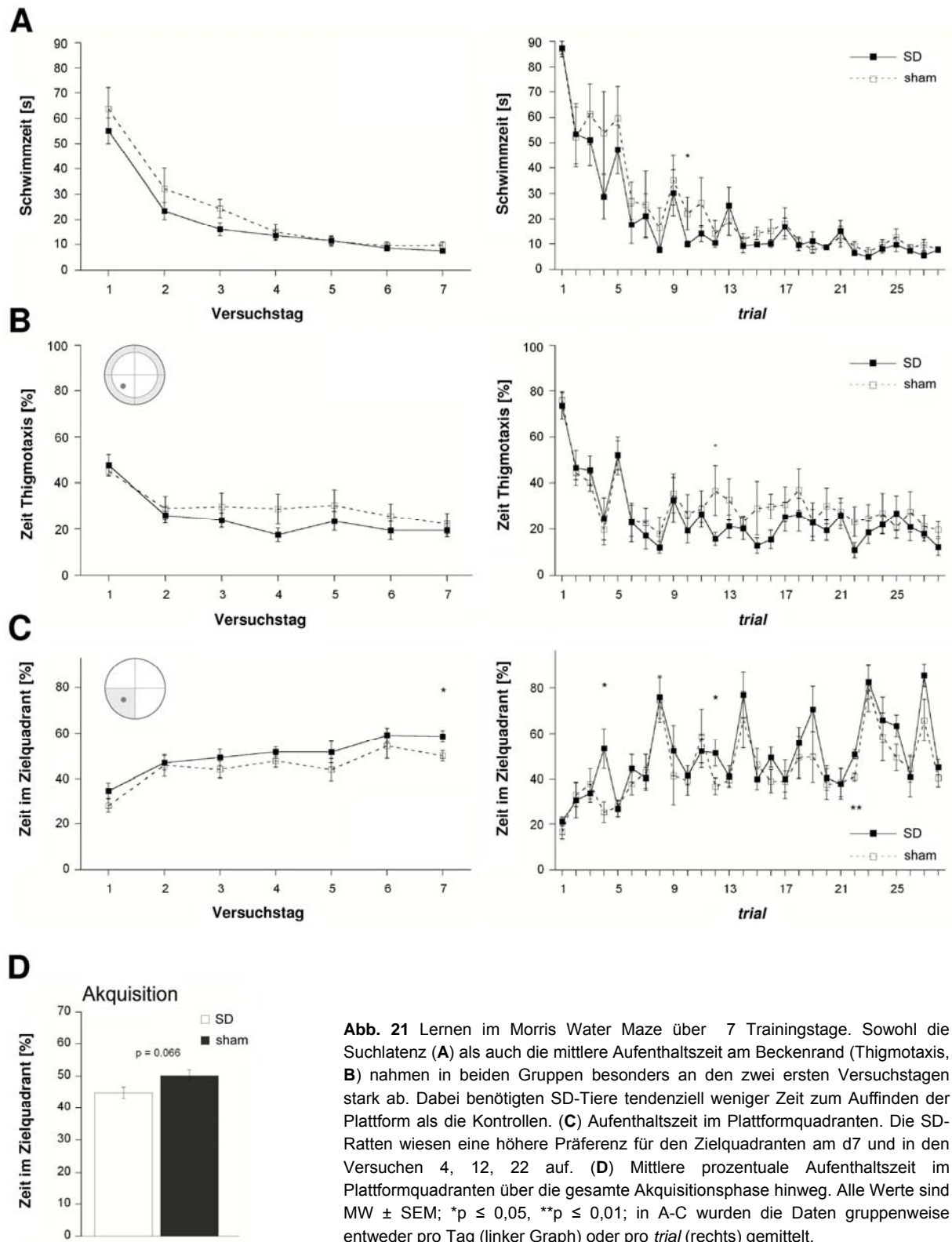
Um die räumliche Lern- und Gedächtnisleistung nach SD zu überprüfen, wurden 2 Versionen des Morris Water Maze (MWM) Tests durchgeführt. In dieser Aufgabe werden die Ratten in ein rundes Wasserbecken gesetzt und müssen dort eine unsichtbare Plattform suchen. Dabei bietet das Becken selbst keine Anhaltspunkte zur Navigation, die Tiere müssen sich an Markierungen außerhalb des Beckens orientieren. Als Parameter für das Lernvermögen der Tiere dienen die zurückgelegte Zeit oder Strecke zum Erreichen der Plattform oder in bestimmten Bereichen des Beckens.

Standard Morris Water Maze

Dieser Test wurde in Anlehnung an das ursprünglich von Morris entwickelte Protokoll durchgeführt [153]. Die Akquisitionsphase dauerte 7 Tage, wobei sich die unsichtbare Plattform immer an derselben Stelle befand. Am Ende des Trainings wurde das räumliche Erinnerungsvermögen der Ratten im Becken ohne Plattform getestet.

Akquisitionsphase. Während des Trainings zeigten sowohl SD- als auch Kontrolltiere eine signifikante Reduktion der Suchzeit zwischen d1 und d2 ($p_{SD} < 0.001$ und $p_{sham} = 0.015$; Abb. 21A). Diese setzte sich noch bis zum d6 fort, unterschied sich jedoch nicht signifikant zwischen den einzelnen Versuchstagen. Außer im *trial* 10 ($p = 0.05$) gab es nur tendenziell gruppenspezifische Unterschiede der Suchlatenzen. SD-Tiere schwammen durchschnittlich 19.4 ± 1.3 s, während sham-Tiere 23.7 ± 3.1 s benötigten. Die Präferenz für den Zielquadranten (SW) nahm in beiden Gruppen im Zeitverlauf zu (Abb. 21C). Über die gesamte Trainingsphase betrachtet, verbrachten SD-Tiere tendenziell mehr Zeit im Zielquadranten als die Kontrollen (Abb. 21D). Geringe Unterschiede zeigten sich bei differenzierter Betrachtung der einzelnen Versuche (*trials*) und Versuchstage (*sessions*): SD-Ratten hielten sich durchschnittlich mehr im Zielquadranten auf als sham-Tiere in den *trials* 4 ($p = 0.018$), 12 ($p = 0.05$) und 22 ($p = 0.008$; Abb. 21C rechts). Die Analyse der Versuchstage ergab eine längere Verweildauer der SD-Tiere im Zielquadranten am d7 ($p = 0.036$). Die Kontrolltiere hielten sich tendenziell etwas häufiger am Beckenrand auf als SD-Tiere (Abb. 21B).

Extinktionsphase. Am d7, 22 und 43 nach Beginn des Trainings wurden *probe trials* durchgeführt, in denen die Plattform aus dem Becken entfernt wurde. Dieser Test dient der Analyse des räumlichen Gedächtnisses, ausgewertet wurde die Zeit, die sich die Tiere im früheren Zielquadranten aufhielten. In keinem der Tests zeigten die SD-Ratten ein anderes Verhalten als die Kontrollgruppe. Im *probe*



trial 1 verbrachten beide Gruppen die meiste Zeit (ca. 55 %) im früheren Zielquadranten (Abb. 22A).

Zwei Wochen später war die Gedächtnisspur bereits gelöscht, die Tiere hielten sich etwa ebenso lange im ehemaligen Plattform- wie in den anderen Quadranten auf (SD: 22.2 ± 3.5 %; Kontrollen:

24.0 ± 4.5 %). Dies wurde auch im letzten *probe trial* beobachtet. Ebenso ergaben sich keine Gruppenunterschiede bei der Analyse des thigmotaktischen Verhaltens (Abb. 22B). Da die Extinktionsdurchgänge mit 60 s relativ lang waren und Ratten in diesem Test relativ schnell dazu neigen, die Suche aufzugeben, wenn sie die Plattform nicht am gewohnten Ort vorfinden, wurden die *probe trials* zusätzlich in 15 s-Intervallen analysiert (Abb. 22C, D). Auch hier ergaben sich keinerlei gruppenspezifischen Unterschiede in der Präferenz für den früheren Plattformquadranten. Allerdings gab es eine deutliche Differenz bezüglich des thigmotaktischen Verhaltens in den ersten 15 s des dritten *probe trials*.

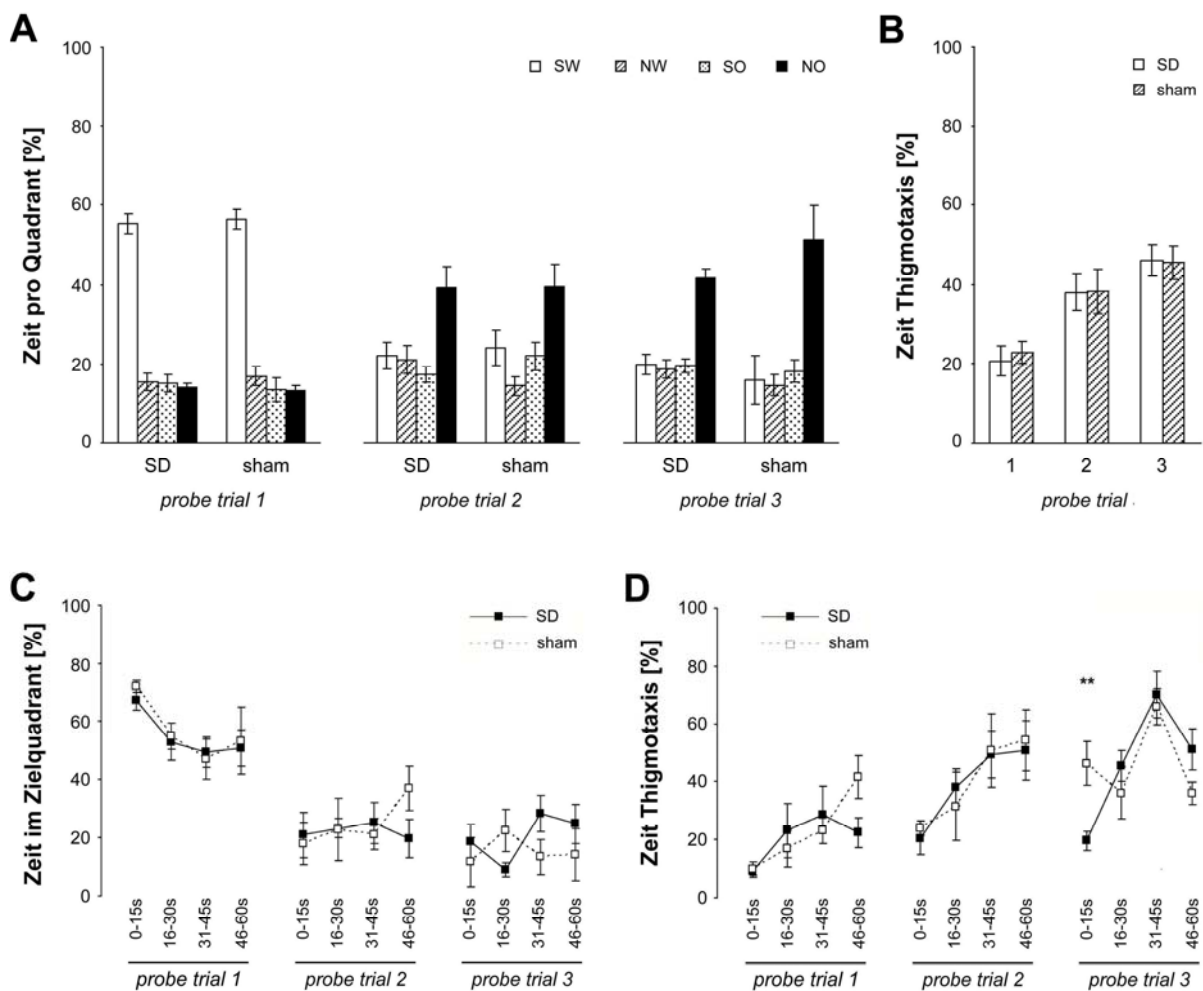


Abb. 22 Prozentuale Aufenthaltszeit in verschiedenen Bereichen des MWM in der Extinktionsphase. **(A)** Mittlere Verweildauer der SD- und Kontrolltiere in den 4 Quadranten während der 60-sekündigen *probe trials*. Im ersten *probe trial* verbrachten alle Tiere die meiste Zeit im früheren Plattformquadranten (SW). In den anschließenden *probe trials* unterschied sich die Aufenthaltszeit im Ziel- nicht mehr von der in den anderen Quadranten, jedoch verbrachten die Tiere nun mehr Zeit in dem Quadranten, in dem sie ins Becken gesetzt wurden (NO). **(B)** Das thigmotaktische Verhalten zeigte keine gruppenspezifischen Unterschiede. Nur in den ersten 15 s des 3. *probe trials* hielten sich SD-Ratten weniger am Beckenrand auf als die Kontrollen

(D). (C) Verlaufskurven für die Aufenthaltsdauer der Tiere im ehemaligen Zielquadranten in 15 s-Intervallen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ** $p \leq 0.01$.

Modifiziertes Water Maze

Ob SD die Flexibilität des räumlichen Lernens beeinflussen kann, wurde mit Hilfe einer Variante des MWM, die in der Gruppe von Schallert entwickelt wurde, untersucht [155].

Training. Zu Beginn des Trainings zeigten SD- und sham-Tiere ein thigmotaktisches Verhalten (Abb. 23C), beide Gruppen lernten jedoch relativ schnell sich vom Beckenrand wegzubewegen und im Zielquadranten (SW) nach der Plattform zu suchen (Abb. 23B). Dieser Effekt war am ersten Trainingstag (*trials 1-4*) am deutlichsten ausgeprägt. Ebenso nahm die Suchlatenz zum Auffinden der verborgenen Plattform bei beiden Gruppen im Laufe des Trainings sukzessive ab (Abb. 23A).

Probe trial 1. Am d4 schloss sich unmittelbar nach dem letzten *trainings trial* ein 30-sekündiger *probe trial* an, in dem die Plattform aus dem Becken entfernt wurde. Hier zeigten SD-Tiere eine Präferenz für den ehemaligen Plattformquadranten (42.9 ± 4.4 %), während die Kontrollen etwa gleich viel Zeit in jedem Quadranten verbrachten (27.4 ± 4.9 % in SW; Abb. 23D). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Ebenso unterschied sich das thigmotaktische Verhalten nicht, beide Gruppen hielten sich etwa gleich häufig in der Peripherie des Beckens auf (SD: 31.0 ± 3.0 %; sham: 42.4 ± 7.5 %; Abb. 23E).

Strategy switching test. Am d5 und d6 mussten sich die Tiere zum erfolgreichen Absolvieren der Aufgabe eine neue Suchstrategie aneignen. An beiden Tagen wurden je 6 *strategy switching trials* durchgeführt, in denen sich die Plattform an wechselnden Positionen am Beckenrand befand. Zunächst war in beiden Gruppen ein leichter Anstieg der Suchlatenz zu beobachten (Abb. 23A), diese nahm jedoch im Verlauf des Tests sukzessive ab. Die Aufenthaltszeit im früheren Zielquadranten war von Beginn an vermindert (Abb. 23B). Im Gegenzug lernten die Tiere sehr rasch, in der Beckenperipherie zu suchen, die Präferenz stieg über die 12 *strategy switching trials* kontinuierlich an (Abb. 23C).

Probe trial 2+3. Im anschließenden *strategy probe trial*, in dem die Ratten wieder 30 s im Becken ohne Plattform schwimmen mussten, verbrachten sowohl SD- also auch Kontrolltiere etwa gleich viel Zeit in den einzelnen Quadranten (Abb. 23D). Beide Gruppen zeigten keinerlei Präferenz mehr für den ehemaligen Zielquadranten. Im Vergleich zum *probe trial 1* suchten SD-Tiere jetzt signifikant weniger

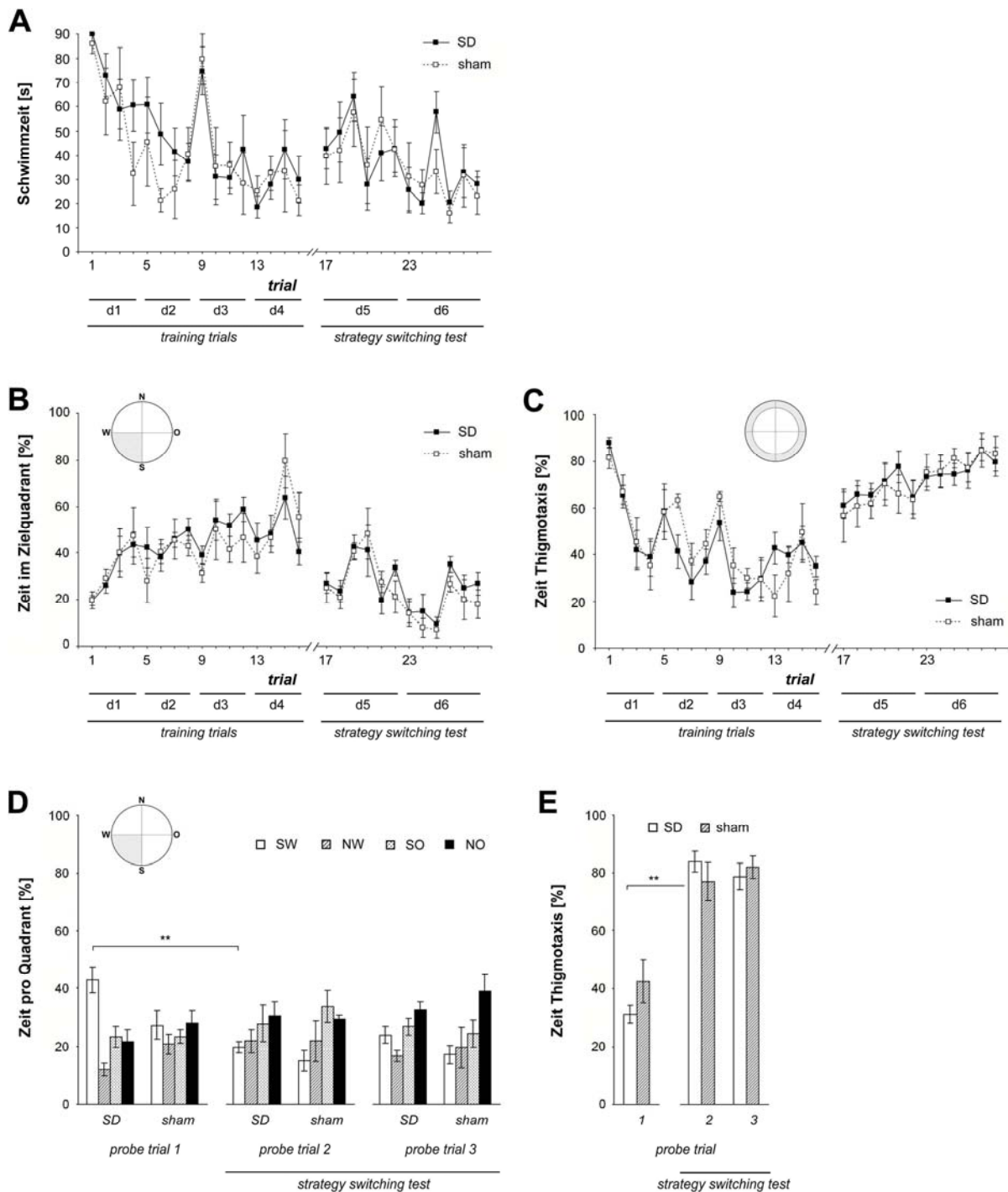


Abb. 23 Modifiziertes MWM. **(A)** Schwimmzeit bis zum Auffinden der Plattform. Die Suchlatenz nahm in beiden Gruppen in den ersten zwei Trainingstagen (*trials* 1-8) stetig ab und blieb in den folgenden *trainings trials* (d3-4) auf etwa gleichem Niveau. Durch den Strategiewechsel am d5 benötigten die Tiere wieder etwas mehr Zeit, um die nun am Rand positionierte Plattform zu lokalisieren. **(B)** Prozentuale Zeit im Zielquadranten an 4 aufeinanderfolgenden Trainingstagen und während des *strategy switching test*. Während des Trainings (d1-4) mit der Plattform im SW-Quadranten steigerten beide Gruppen ihre Präferenz für den Zielquadranten, besonders am d1. Diese nahm im *strategy switching test* wieder ab. **(C)** Prozentuale Verweildauer in der Peripherie des Beckens. In beiden Gruppen nahm der Anteil des thigmotaktischen Verhaltens im Zuge des Trainings (d1-4) ab, während die Tiere relativ schnell mit einem präferentiellen Aufenthalt am Beckenrand auf die Änderung des Experimentaufbaus an d5-6 reagierten. **(D)** Aufenthaltszeit der Ratten im ehemaligen Plattformquadranten in den *probe trials*. Im *probe trial* 1, der sich direkt an das Training der Tiere im Becken mit der Plattform im SW-Quadranten anschloss, verbrachten die SD-Tiere tendenziell mehr Zeit im Zielquadranten als die sham-Tiere. Der Strategiewandel führte dazu, dass sich die Tiere in den *probe trials* 2 + 3 in etwa gleich lange in jedem Quadranten und weniger als im ersten *probe trial* im SW-Quadranten aufhielten. **(E)**

zeigt den Anteil thigmotaktischen Verhaltens in den *probe trials*. der *strategy switching test* führte zu einer starken Steigerung der Suchzeit am Beckenrand. Alle Werte sind MW \pm SEM, **p \leq 0.01.

im früheren Plattformquadranten. Der Test zeigte deutlich, dass in beiden Gruppen ein Wechsel zurück zur thigmotaktischen Suchstrategie stattfand (Abb. 23E). Die prozentualen Aufenthaltszeiten im SW-Quadranten und in der Beckenperipherie änderten sich im folgenden *strategy probe trial* (*probe trial 3, d6*) nicht mehr.

Zusammenfassend ergaben sich in beiden Paradigmen keine bedeutenden Unterschiede in der Lern- und Gedächtnisleistung. Im traditionell durchgeführten MWM zeigte sich zwar eine gewisse Tendenz, dass SD-Ratten den Test besser erlernen können, allerdings waren die Differenzen zu den Kontrollen nur sehr gering.

DISKUSSION

Spreading depressions (SD) werden als potentielle pathogenetische Faktoren verschiedener neurologischer Erkrankungen angesehen. Unter diesem Gesichtspunkt befasste sich die vorliegende Studie hauptsächlich mit solchen SD-Effekten, die möglicherweise für das Verständnis dieser Erkrankungen, speziell des Schlaganfalls, von Bedeutung sein könnten. Damit lag der Focus zum einen auf den molekularen Konsequenzen von SD im Kortex der ipsilateralen Hemisphäre, andererseits sollte der Einfluss kortikaler SD auf die hippocampale Neurogenese und die Lern- und Gedächtnisleistung analysiert werden.

Differentielle Genexpression nach kortikaler SD

Kann die Microarray-basierte Genexpressionsanalyse einen repräsentativen Überblick über die molekularen Veränderungen nach SD geben?

Die Genom-weite Transkriptionsanalyse mit Hilfe von Microarrays (MA) ermöglicht einen umfassenden Einblick in die Reaktionen von Zellen auf innere oder äußere Stimuli. In der vorliegenden Arbeit wurde die MA-Technologie eingesetzt, um die Genexpression und deren zeitlichen Verlauf im Kortex von Ratten nach SD zu charakterisieren. Hierfür wurden Affymetrix RAE230A-Chips verwendet, die ermöglichten, ca. 14000 UniGene Cluster (in etwa 16000 *probe sets*, im folgenden als Gene oder Transkripte bezeichnet) gleichzeitig in einer Probe zu analysieren.

In die paarweise Vergleichsanalyse gingen nur solche Gene ein, die auf mindestens einem der Chips detektierbar waren (*absolut call = present*). Eine differentielle Expression wurde angenommen, wenn der Vergleich von SD- zu sham-Probe einen *change p-value* < 0.0045 oder > 0.9955 (*increase-* oder *decrease call*) ergab und wenn das Gen in einer der Proben mindestens doppelt so hoch exprimiert war als in der anderen. Diese relativ stringenten Einschlusskriterien mussten gesetzt werden, um eine verlässliche Aussage ohne die Durchführung von Replikaten treffen zu können. Sie führten jedoch auch zum Ausschluss bekannter SD-assoziierter Gene.

Dies traf z.B. für *MMP-9*, *tPA*, *GFAP*, *clusterin* oder verschiedene inflammatorische Gene wie *IL-1 α* und *IL-6* zu, für die ein Anstieg der mRNA-Expression nach SD bereits beschrieben wurde [9, 10, 173-177]. Diese Studien nutzten unterschiedliche Detektionsmethoden (*in situ* Hybridisierung, Immunhistochemie, PCR), wobei jeweils nur einzelne Gene analysiert wurden, womit eine verlässliche

Analyse und Prüfung auch von gering exprimierten Genen oder kleinen Änderungen (oft < 2) möglich war (für die Fülle der in der vorliegenden Studie detektierten Gene war eine einzelne Überprüfung ausgeschlossen, wobei die Rohdaten jederzeit für entsprechende spätere Analysen zur Verfügung stehen). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Gene nicht in die Kandidatengenliste eingeschlossen, entweder weil ihre Abundanz in den Proben zu gering war oder weil sie weniger als 2-fach reguliert waren. Beispielsweise wurden *MMP-9* und *IL-6* aufgrund ihrer sehr niedrigen Expression (*absent call* auf jedem Chip) aus der Trefferliste ausgeschlossen. Abgesehen davon ergab die Vergleichsanalyse, dass SD zu einer 2.6-fachen Heraufregulation von *MMP-9* und einer 5.3-fachen Erhöhung des *IL-6*-Transkriptes führten. *GFAP*, *tPA* und *clusterin* wiederum gingen zwar in die Vergleichsanalyse ein (*present call*), wurden jedoch aufgrund kleiner *fold changes* aus den Trefferlisten ausgeschlossen (*tPA* 1.9-fach \uparrow nach 3 h, *GFAP* 1.7-fach und *clusterin* 1.4-fach \uparrow 7 d nach SD). Der Verlust richtig-positiver Gene war jedoch mit Hinblick auf die gleichzeitige Reduktion falsch-negativer Treffer zu verantworten.

Einige Limitationen der Microarray-Technologie machen eine Überprüfung mit unabhängigen Methoden zwingend notwendig. Zum einen ist es bis dato sehr schwierig, gering exprimierte Gene oder kleinere Expressionsunterschiede gesichert zu erfassen. Dies führt v.a. bei der Analyse von Geweben immer wieder zu Problemen, selbst große Änderungen können, wenn sie in einer sehr kleinen Zellpopulation auftreten, „ausgedünnt“ bzw. maskiert werden. Diesem Problem kann z.B. durch zusätzliche *in situ* Hybridisierung, Immunhistochemie oder Analyse von mikrodisektiertem Material beigegeben werden.

Auch das Poolen der Proben, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen, birgt sowohl Vor- als auch Nachteile. Allgemein akzeptiert ist, dass es die Effizienz und Zuverlässigkeit von Analysen steigern kann. Dies geschieht jedoch auf Kosten des Informationsgehaltes über interindividuelle Variabilität und ist oftmals auch mit einer Maskierung von geringen Effekten verbunden [169].

Schlussendlich kann von Microarrayanalysen nur mit Einschränkungen auf die funktionelle Relevanz der beobachteten mRNA-Änderungen geschlossen werden, da eine differenzielle Genexpression nicht immer zwangsläufig zu Änderungen der Abundanz der korrespondierenden Proteine führt. Hierfür sind sowohl generelle, als auch bekannte, SD-spezifische Diskrepanzen zwischen Gen- und Proteinexpression verantwortlich. Darauf soll im folgenden Absatz eingegangen werden.

Studien zur Korrelation von mRNA- und Proteinexpression wurden in Hefepilzen durchgeführt [178-180]. Eine zu diesem Zweck von Greenbaum *et al.* entwickelte Methode, verschiedene Gen- und Proteinexpressionsdatensätze zusammenzuführen und vergleichbar zu machen, zeigte, dass Transkriptom und Translatom in ihrer Gesamtheit relativ schlecht miteinander korreliert sind ($r = 0.66$). Darüberhinaus gelang die Identifizierung gruppenspezifischer Auffälligkeiten: (i) mRNA- und Proteinexpression korrelierten in einigen Kategorien von Genen besser (z.B. Nukleolus), in anderen schlechter (z.B. Mitochondrien) [170, 180]; (ii) außerdem waren Proteine bestimmter funktioneller Gruppen tendenziell höher exprimiert als es die mRNA-Expression erwarten ließ (z.B. zelluläre Organisation, Proteinsynthese, Energiestoffwechsel), andere niedriger (z.B. Transkription, Wachstum, Differenzierung, DNA-Synthese).

Ferner ist für SD selbst ein modulatorischer Einfluss auf die ipsilaterale Proteinsynthese beschrieben. Anfangs kommt es zu einer einige Stunden andauernden Inhibition, später zu einer Steigerung der globalen Proteinsynthese [54-56]. Inwieweit hier eine generelle Entkopplung von Gen- und Proteinexpression zugrunde liegt, ist nicht bekannt. Dagegen sprechen bislang veröffentlichte Studien, die sich mit der Expression einzelner Transkripte und korrespondierender Proteine beschäftigten und in denen deren Co-Regulation belegt werden konnte [10, 56-61].

Aus den erläuterten Gründen wurden die Microarraydaten einer sekundären Analyse unterzogen. Zur Validierung der Daten wurden zunächst qRT-PCR Untersuchungen am gleichen Probenmaterial durchgeführt. Von den 12 überprüften Transkripten zeigten alle in den gepoolten Proben untersuchten Gene eine sehr gute Übereinstimmung mit den Chipdaten. Aufschluss, inwieweit die Pools den Zustand individueller Proben widerspiegeln, gaben die Analysen der RNAs von Einzeltieren. Besonders für die stark exprimierten Gene stimmten die Einzeldaten sehr gut mit denen vorher in Pools ermittelten Änderungen überein. In Übereinstimmung mit anderen Studien konnte in < 30 % der Einzelanalysen die mittels MA ermittelte differentielle Expression nicht reproduziert werden [181, 182]. Microarray- und PCR-basierte Untersuchungen geben jedoch weder Aufschluss über die Spezifität der Zellen, welche das entsprechende Molekül exprimieren, noch über die Expression des funktionellen Proteins. Dementsprechend wurden sie durch immunhistochemische Studien ergänzt. Alle vier analysierten Proteine (*c-Fos*, *Stat3*, *Cox2*, *hsp27*) waren, wie durch die Microarray-Analyse vorhergesagt, ipsilateral heraufreguliert. Dabei war die Kinetik der Proteinexpression meist etwas langsamer als auch langanhaltender als die der Transkripte. Die Mehrfachimmunfluoreszenz

ermöglichte, die betroffenen Zellpopulationen zu identifizieren: c-Fos und Cox-2 wurden ausschließlich in Neuronen heraufreguliert, während die hsp27-Expression auf Astrozyten beschränkt war. Stat3 war in normalem Gewebe niedrig in fast allen Neuronen und wenigen Astrozyten exprimiert, während es nach SD hauptsächlich in den Astrozyten heraufreguliert wurde. Desweiteren zeigte sich besonders für Cox-2 eine klare schichtspezifische Expression, ein ähnlicher Befund lag bereits aus einer anderen Studie vor [61].

Die vorliegende Studie ist die bislang umfangreichste Untersuchung der Genexpression nach SD. Sie bietet eine Übersicht der molekularen Veränderungen im ipsilateralen Kortex. Allerdings bleibt die funktionelle Interpretation der Daten zu einem hohen Grad artifiziell, da wie oben ausgeführt nicht zwangsläufig davon ausgegangen werden kann, dass auch die korrespondierenden funktionellen Proteine synthetisiert werden. Erst durch weitere prospektive Studien können gesicherte Aussagen zur funktionellen Relevanz der beobachteten Veränderungen getroffen werden. Denkbar sind Proteom-übergreifende Analysen der Proteinexpression (SELDI, etc.), anschließende immunhistochemische Untersuchungen ausgewählter Proteine und vor allem funktionelle Studien, beispielsweise mit Hinblick auf einen möglichen neuroprotektiven Effekt der nach SD regulierten Gene (z.B. durch siRNA- oder *knock-out* Technologie).

SD reguliert unterschiedliche funktionelle Gruppen von Genen über einen langen Zeitraum hinweg

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass SD weitreichende Effekte auf die kortikale Genexpression ausüben. Verschiedene funktionelle Gruppen von Genen wurden in sequentieller Abfolge durch SD beeinflusst, zum Teil bis 30 Tage später. Eine Übersicht über die Veränderungen und deren zeitlichen Verlauf geben Abb. 11 und die Tabellen 6-16, und A-E im Anhang. Gene, für die bereits früher ein Zusammenhang mit SD gezeigt werden konnte, sind dort schattiert hervorgehoben. Im folgenden sollen die Genexpressionsänderungen basierend auf den Funktionen ihrer Proteinprodukte diskutiert werden.

Unmittelbar nach dem Auftreten von SD kam es zur Heraufregulation einer Reihe von ***immediate early Genen/Transkriptionsfaktoren*** (IEG). Einige dieser Gene, wie z.B. *c-FOS*, *c-Jun*, *EGR1*, *PC3*, *Arc*, *BDNF*, *Cox2*, *hsp27*, waren bereits aus früheren Studien bekannt [7, 9, 21, 57, 61]. Für viele Gene ist dies die erste Beschreibung im Zusammenhang mit SD (z.B. *NGFI-B*, *EGR2*, *EGR4*, *FRA1*, *FRA2*, *ATF3*, *PC4*). Vertreter der EGR-Genfamilie (hier: *EGR1*, *EGR2*, *EGR4*) beeinflussen

genetische Programme, die in Prozesse wie Wachstum, Differenzierung oder neuronale Plastizität eingreifen [183, 184]. Drei von vier Mitglieder der FOS-Familie (*c-Fos*, *FRA1*, *FRA2*), zwei der JUN-Familie (*c-Jun*, *JunB*) und *ATF3* wurden durch SD induziert. Deren Genprodukte sind Bestandteile des Transkriptionsfaktors AP-1. Dieser kann abhängig von der Zusammensetzung seiner Untereinheiten als Aktivator oder Repressor der Genexpression fungieren und somit ein komplexes Muster zellulärer Mechanismen kontrollieren. Dazu gehören z.B. der Metabolismus, Wachstum, Migration und Apoptose [185-189]. Entsprechend konnte im vorliegenden Datenset eine Reihe potentieller AP-1 Zielgene als differentiell exprimiert identifiziert werden (z.B. *TIMP1*, *BDNF*, *MCP-1*).

Keines der für **intrazelluläre Signalmoleküle** kodierenden Gene wurde bisher im Kontext mit SD beschrieben. Fünf dieser Moleküle sind MAP-Kinasephosphatasen (MKP/DUSP), deren Funktion die Regulation von MAPK-Kaskaden (Mitogen-activated protein kinase) ist [190]. MAPK regulieren wiederum eine Reihe von Prozessen, darunter Wachstum, Proliferation und Apoptose. Andere Gene in dieser funktionellen Kategorie, die durch SD induziert wurden, sind in G-Protein-Signalwege involviert (z.B. *RGS2*, *RGS4*, *RASD1* and 2). *Jak2* und *Stat3* wurden co-direktional heraufreguliert mit ihren downstream-Targets *Pim3* und *sprouty 2*. Der JAK/STAT-Signalweg vermittelt Effekte von Zytokinen, aber auch Wachstumsfaktoren. Er kontrolliert biologische Prozesse wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose [191]. Ebenfalls innerhalb der ersten 24 h nach SD wurden zwei Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinasen induziert. Diese Enzyme vermitteln die neuronale Antwort auf Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.

Apoptotische Signalwege waren kaum durch SD beeinflusst. Der Chip detektierte eine verminderte Expression des pro-apoptotischen Gens *DRAK2* und einen Anstieg des potentiellen Inhibitors neuronalen Zelltodes *PC3*. Darüber hinaus gab es keine Hinweise, dass es durch SD zu einer veränderten Expression klassischer Apoptosemarker, wie von Caspasen, *Granzyme B*, *BAX* (*p53*) oder *Bcl-2* kam. Dies stützt die Befunde von Nedergaard & Hansen, dass durch SD keinerlei Schädigungen des kortikalen Gewebes hervorgerufen werden [73]. *PC3* scheint eine zentrale Rolle bei der Entstehung und dem Überleben neuer Nervenzellen innezuhaben. Beispielsweise führt eine Überexpression von *PC3* in NGF-stimulierten PC12-Zellen zu einer Wachstumsinhibition und Steigerung der neuronalen Differenzierung, während *PC3*-Antisenseoligonukleotide zum Zelltod führten [192]. Iacopetti und Kollegen identifizierten *PC3* als Neurogenesemarker, dessen Expression im sich entwickelnden ZNS auf die ventrikuläre Zone beschränkt ist [193]. *In vitro* ließ sich *PC3* durch Membrandepolarisierungen aufgrund hoher K^{+} -Konzentrationen induzieren [194].

Die Gruppe der **Kanalproteine** schloss Gene ein, deren Produkte eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Ionenhomeostase spielen: zwei K^+ - (*KCNV1*, *KCNF1*) und zwei Ca^{2+} -Kanäle (*CACNA1B*, *CACNG3*). Änderungen in der Expression dieser Kanäle kann die zelluläre Erregung beeinflussen. Zusätzlich führten SD unmittelbar zur Heraufregulation des im Hirn vorherrschenden Wasserkanals *Aquaporin 4*, wie auch von drei Na^+/K^+ -ATPasen. Letztere gewährleisteten den aktiven Transport von Na^+ - und K^+ -Ionen zwischen intrazellulären und extrazellulären Kompartimenten. Ihre Induktion könnte als kompensatorische Antwort auf die massiven Ionenverschiebungen während SD angesehen werden.

SD stellen für das Gewebe einen gewissen Stress dar. Konsistent damit wurden mehrere sog. **Stress response Gene** induziert. Die Heraufregulation des anti-oxidativen *Metallothionin 1* und des DNA-Reparaturenzyms *GADD45 γ* wurde bereits im ischämischen *remote*-Kortex, allerdings bisher noch nicht nach SD nachgewiesen [8, 195]. Ebenfalls konnten *HSC40* und *HSPF1* erstmals mit SD assoziiert werden. Sie fungieren vermutlich als Chaperone und sind damit an der Elimination denaturierter Proteine beteiligt. Einen Tag nach SD wechselte die Stressantwort zu *hsp27* und *hsp32* (*HO-1*). Beide wurden bereits früher mit SD assoziiert [57, 63], wobei *hsp27*, wie in der vorliegenden Arbeit bestätigt, in Astrozyten heraufreguliert war. Übereinstimmend mit anderen Arbeiten, konnte weder eine Expressionsänderung anderer Hitzeschockproteine (wie z.B. *hsp70* oder *hsp72*), noch von Superoxiddismutasen, detektiert werden [66, 196].

Die Aktivierung **neurotropher Kaskaden** durch SD wurde bereits von anderen Autoren berichtet [64-66]. In der vorliegenden Studie konnten nur *BDNF* und sein Rezeptor *trkB* als differenziell exprimiert identifiziert werden. Eine Induktion von z.B. *bFGF* wurde nicht detektiert. Studien nach adenoviraler *BDNF*-Überexpression in der ventrikulären Zone von Ratten als auch an *BDNF*-knock-out Mäusen belegen eine Funktion von BDNF bei der Bildung neuer Nervenzellen [197, 198]. *BDNF* unterstützt das Überleben von Neuronen *in vivo* und *in vitro* [199, 200]. Eine Studie zeigte, dass die intravenöse Verabreichung von BDNF den funktionellen Ausgang nach photothrombotischen Infarkten verbessert [201]. In aktuellen Studien verdichten sich die Hinweise, dass BDNF über Aktivierung des *trkB*-Rezeptors direkt in die synaptische Transmission eingreift [202].

SD induzierten eine Reihe von Genen, deren Funktion mit der neuronalen Signalübermittlung assoziiert ist. Die Gruppe der **synaptischen Proteine** umfasste Gene, die die Aktivität von Rezeptoren oder den Vesikeltransport regulieren. Das Proteinprodukt von *Homer 1* liegt hauptsächlich an exzitatorischen Synapsen vor, wo es die Signalübertragung metabotroper Glutamatrezeptoren

moduliert [203]. *STXBP1*, *STX1a* und *SYT4* sind in die Ca^{2+} -vermittelte synaptische Freisetzung von Vesikeln involviert [204-206]. In der Literatur gibt es Hinweise, dass SD auch direkt in Neurotransmittersysteme eingreifen. Dort wurde eine Induktion von *Galanin*, dessen Rezeptor *GalR1* und der Chromogranine *CgB* und *CgC* beschrieben [59, 69]. In der vorliegenden Studie wurde nur ein Anstieg von *CgC* detektiert.

SD induzierte im Verlauf des ersten Tages Gene, deren Produkte eine Rolle bei der **Immunantwort** spielen, so beispielsweise *Cox2* oder die Makrophagen/Monozyten-assoziierten Chemokine *MCP-1*, *MIP-1 α* , *MIP-1 β* . Eine Studie des letzten Jahres befasste sich mit der inflammatorischen Antwort des Gehirns auf SD [177]. Die Autoren detektierten eine differenzielle Expression einer Reihe inflammatorischer Gene (z.B. *TNF α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *eNOS*, *MIP-1 α*). Viele dieser Gene waren auch in der vorliegenden Studie reguliert, allerdings wurde ein Großteil von den Trefferlisten ausgeschlossen (siehe vorangehender Abschnitt). Nach 7 d waren *CD74/HLA-DR γ* und *Lectin*, beides Marker mikroglialer Aktivierung, heraufreguliert. Dies, und die Induktion verschiedener inflammatorischer Gene deuten darauf hin, dass SD zur Aktivierung von Mikroglia führen. Dieser Befund passt zu einer früheren Arbeit von Gehrman *et al.*, die eine erhöhte Anzahl von Mikroglia und eine Heraufregulation von Mikroglia-/Makrophagen-Markern nach SD beschrieben haben.

Auch verschiedene **Metabolismus**-assoziierte Gene wurden unmittelbar nach SD heraufreguliert. Zum einen scheint der Energiemetabolismus durch SD verändert zu werden, z.B. durch eine Induktion des *Phosphofruktokinase*-Gens, dem Flaschenhalsenzym der Glykolyse. Dies könnte als Reaktion auf den hohen Energiebedarf angesehen werden, welcher zur Wiederherstellung der Ionengradienten nach SD besteht. Außerdem waren verschiedene Enzyme der Cholesterol- (z.B. *HMGCR*, *IDI1*) und Prostaglandinsynthese (*Cox2*, *PTGES*) induziert. Zu den biologischen Effekten von Prostaglandinen gehört die Induktion von *eNOS* im Endothel der zerebralen Mikrogefäße, welches dort die Hämodynamik beeinflusst [207]. Entsprechend wurde die Heraufregulation von *eNOS* 3 h nach SD beobachtet. Nicht zuletzt wurden in den ersten 24 h zahlreiche Gene identifiziert, die mit dem mRNA- und Proteinmetabolismus assoziiert sind (e.g. *RAMP4*, *EIF4A1*). Diese Gene sind möglicherweise an dem regulatorischen System beteiligt, welches für die biphasische Veränderung der Proteinsynthese nach SD verantwortlich ist [54-56].

SD zog auch eine differentielle Expression von **Zytoskelett**-assoziierten Genen nach sich. Unmittelbar nach SD waren *MAP2* und *MAP6* heraufreguliert. Diese beeinflussen die Dynamik neuronaler Mikrotubuli. Einen Tag später waren primär dem Aktin-Zytoskelett zugehörige Transkripte

erhöht. Betroffen waren β -Aktin selbst, wie auch *RiL*, welches den Umsatz von Aktinstressfasern moduliert, und *S100A10*, das die Organisation von Aktinfasern, die Membranarchitektur und die Verteilung von Ionenkanälen reguliert [208-210].

Die meisten der beobachteten Veränderungen hatten eher transienten Charakter und traten sehr rasch nach SD auf. Nur wenige Gene waren zu mehr als einem Zeitpunkt reguliert. In diese Gruppe gehörten z.B. der Matrixmetalloproteinase-Inhibitor *TIMP1*, welcher von 3 h bis eine Woche nach SD heraufreguliert war. Der Inhibition von Matrixmetalloproteinasen wurde erst kürzlich eine neuroprotektive Funktion zugeschrieben, was sich nach intrazerebralen Blutungen in einer Reduktion des Ödems, der Infiltration von Neutrophilen Granulozyten und des oxidativen Stress äußerte [211]. Ein Gen mit verzögerter Expression war das Transthyretin (*TTR*). Dies ist der wichtigste Thyroxin (T_4) – und Retinoltransporter von Rodentia [212]. *TTR*, wie auch *Albumin* (als zweiter T_4 -Transporter), waren 24 h nach SD herabreguliert, und *TTR* nach 1 Monat heraufreguliert. Somit scheint SD auch mit T_4 - und Retinolsäuresignalwegen zu interferieren. Thyroidhormone und Retinolsäure fungieren als Transkriptionsaktivatoren von Genen, die z.B. die Hirnentwicklung, Differenzierung und Migration von Neuronen im zerebralen Kortex, die Entwicklung von Oligodendrozyten oder die Axonmyelinisierung steuern [213-216]. Beobachtungen an *TTR*-Null-Mäusen, die normale T_4 - und T_3 -Konzentrationen in ihrem Hirnparenchym aufwiesen, ließen Palha *et al.* schließen, dass die Hauptfunktion von *TTR* in der Regulation freier Thyroidhormonlevel liegt [217, 218]. Da nur die freien Hormone biologisch aktiv sind, müssten SD entsprechend dieser Hypothese zunächst zu erhöhten T_4 - und Retinolsäure-Wirkungen führen, während diese später reduziert sind. Eine Heraufregulation von *TTR* im Gehirn wurde auch nach Oligämie beobachtet [219]. *TTR* scheint auch ein Indikator für die Erholung nach einem Schlaganfall zu sein. Im Vergleich zu gesunden Probanden hatten Patienten, die nach einem Schlaganfall verstorben sind, weniger und solche die überlebten, vermehrt *TTR* im Blutserum [220].

Mögliche Schlussfolgerungen zur SD-vermittelten Ischämietoleranz

Ischämietoleranz bezeichnet das Phänomen, welches das Gehirn unempfindlicher gegenüber einem Sauerstoffmangel macht. Die Mechanismen, die dazu beitragen, sind bisher nur unzureichend aufgeklärt. Als einer von mehreren Stimuli, die eine Ischämietoleranz auslösen können, wird auch die SD diskutiert: Eine Reihe von Arbeitsgruppen zeigte, dass repetitive, mindestens einen Tag vor Ischämieinduktion auftretende SD das Infarktvolumen als auch die Anzahl absterbender Neurone vermindern [82-86]. Für die folgende Diskussion ist es wichtig zu erwähnen, dass SD in diesen

Studien durch kortikale Applikation von hochmolarem KCl ausgelöst wurden, während als Kontrolle physiologische Kochsalzlösung diente.

Eine aktuelle Studie zum Einfluss kortikaler Läsionen *per se* stellt die bisher geführten Debatten über einen neuroprotektiven Effekt von SD in ein neues Licht. Desweiteren hebt sie die enorme Bedeutung einer sorgfältig ausgewählten Kontrolle für die Interpretation experimenteller Daten hervor. Diese Studie von Muramatsu *et al.* zeigte, dass eine kleine kortikale Läsion, hervorgerufen durch epidurale Applikation von 5 M NaCl, *per se* schon ausreichend ist, ischämische Toleranz zu induzieren [221]. Da die Applikation jeglicher hochmolarer Elektrolytlösung, eben auch KCl und NaCl, zur Entstehung kleiner Läsionen führt, existiert in den im vorigen Absatz genannten Studien (mit 0.9% NaCl als Kontrolle) neben den SD ein zweiter, gravierender Unterschied zwischen SD- und Kontrollgruppe: die Läsion. Der dort gezogene Schluss, dass der beobachtete neuroprotektive Effekt auf die SD zurückzuführen sei, ist somit nicht vertretbar. Daneben existiert jedoch mindestens eine Arbeit zu diesem Thema, in der equimolare KCl- bzw. NaCl-Lösungen für SD- und Kontrolltiere eingesetzt wurden [66]. Hier war das Volumen eines 3 Tage später durch MCAO induzierten Infarktes nach SD um etwa die Hälfte vermindert, so dass ein neuroprotektiver Effekt von SD eindeutig belegt werden konnte.

Welche der in der vorliegenden Studie beobachteten Veränderungen für die Vermittlung der Ischämietoleranz nach SD verantwortlich zeichnen, ist an dieser Stelle nicht zu klären. Sicherlich ist nahezu jedes der identifizierten Gene ein potentieller Kandidat, da sich der Läsionseffekt durch Verwendung der 3 M NaCl-Kontrolle herauskürzen ließ. Die vorgestellten Daten bieten somit eine Grundlage, molekulare Targets zur Induktion eines neuroprotektiven Effekts zu identifizieren, dafür müssen sich jedoch funktionelle Studien zur Charakterisierung der verantwortlichen Gene anschließen. Die aktuelle Literatur liefert Hinweise auf potentielle Kandidatengene, darunter Hitzeschockproteine, Superoxid-Dismutasen oder Apoptosessuppressoren. Bisher existieren nur wenige Studien, die einen kausalen Zusammenhang zwischen SD-vermitteltem neuroprotektiven Effekt und einem bestimmten Molekül (BDNF, NOS) nachweisen konnten [89, 222].

Vergleich der Genexpressionsmuster nach SD und Schlaganfall

Experimentelle Studien in Ratten fanden eine differentielle Genexpression nach fokalen Ischämien nicht nur im ischämischen, sondern auch im ipsilateralen *remote*-Kortex. Da die verwendeten Modelle meistens sehr klar umschriebene Infarkte verursachten, wurde vermutet, dass die SD-ähnlichen Perinfarktdepolarisationen (PID) für die Induktion von Genen in nicht-ischämischen Kortexregionen

verantwortlich sind [7, 11, 76, 77]. Dies traf etwa für *JunB*, *c-Jun*, *c-Fos*, *BDNF*, *Cox2* oder die Hitzeschockproteine *hsp27* und *hsp32* zu [11, 21, 57, 63, 76, 78, 79]. Viele andere nach fokaler Ischämie beobachteten Expressionsänderungen konnten aufgrund der begrenzten Datenlage bis dato nicht mit SD in Verbindung gebracht werden (z.B. *NGFI-B*, *MIP-1 α* , *Stat3* oder *Synaptophysin*). Anhand der vorliegenden Datensets zur Genexpression nach SD soll an dieser Stelle der Versuch gemacht werden, ihren Anteil an den beobachteten molekularen Effekten nach Schlaganfall abzuschätzen.

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Studien veröffentlicht, deren Inhalt groß angelegte Microarray-basierte Screenings der Genexpression nach fokalen Ischämien waren, allerdings kann nur in wenigen dieser Studien gesichert davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem untersuchten Gewebe um nicht-ischämischen *remote* Kortex handelte [7]. Dort wurden nach photothrombotischen Infarkten 16 differentiell exprimierte Gene identifiziert, 11 davon (*NGFI-A* und *B*, *c-Jun*, *Stat3*, *FRA2*, *MIP-1 α* , *PC3*, *CgC2*, *Arc*, *tPA*, *RGS4*) verhielten sich ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit nach SD beobachtet wurde. Alle anderen bisher publizierten Microarraystudien untersuchten die Genexpression nach Ischämien, die durch den Verschluss hirnversorgender Arterien, meist der *Arteria cerebialis media*, induziert wurden. Diese Modelle ahmen zwar die Pathophysiologie des Schlaganfalls beim Menschen besser nach, bedingen jedoch auch eine große Heterogenität der derzeitigen Datenlage zur Genexpression nach fokaler Ischämie (z.B. unterschiedliche Infarktmodelle und Okklusionszeiten; keine klare Abgrenzung von ischämischen und normoxischen Gewebe, dadurch oft Verwendung unterschiedlich beeinträchtigten Gewebes; unterschiedliche Analysezeitpunkte) und machen eine Zuordnung zum nicht-ischämischen *remote* Kortex schwierig. Im Vergleich mit den bisher publizierten Ischämiestudien wurden > 50 Transkripte mit ähnlichem Expressionsverhalten wie nach SD identifiziert (in den Tabellen 6-16 und A-E mit x markiert), allerdings soll im folgenden nur auf solche Studien eingegangen werden, die sich eindeutig auf den *remote* Kortex beziehen. Beispielsweise wurde eine Infarkt-bedingte Heraufregulation der Hitzeschockproteine *HO-1* (*hsp-32*) und *HO-2* im gesamten ipsilateralen Kortex beschrieben [78, 223]. Hier wurde jedoch nur *hsp-32* durch SD induziert. Ebenso konnte (in Übereinstimmung mit anderen Studien) in der aktuellen Studie keine SD-bedingte Beeinträchtigung anderer Hitzeschockproteine (z.B. *hsp70* oder *72*) oder von Superoxiddismutasen beobachtet werden – Gene, deren Heraufregulation im *remote* Kortex bereits dokumentiert wurde [66, 196, 224, 225]. Honkaniemi *et al.* untersuchten die Expression von Zink-Finger *immediate early* Genen nach permanenter MCAO [14].

Sie konnten zeigen, dass *NGFI-A*, *NGFI-B*, *NGFIC*, *Egr2+3* und *Nurr1* im gesamten ipsilateralen Kortex induziert wurden, ein Effekt, den sie Periinfarktdepolarisationen zuschrieben. Dies konnte in der vorliegenden Studie für alle Gene bestätigt werden. Die in mehreren Studien nach fokaler Ischämie nachgewiesene Induktion der inflammatorischen mRNAs *TNF α* , *IL-1 β* und *iNOS* [226] kann hingegen in der vorliegenden Studie nicht mit SD assoziiert werden, andererseits scheint es einen deutlichen Zusammenhang zwischen Ischämie-induzierter Cox-2-Expression [227] und SD zu geben, auch dies wurde bereits in einer anderen Studie belegt [159]. Andere Studien beobachteten eine verminderte GABA_A-Rezeptorexpression, besonders eine Woche nach photothrombotischen Infarkten [151, 228]. Dabei zeigten auch Redecker *et al.* [228], dass diese nicht durch SD hervorgerufen werden - dies konnte die vorliegende Studie bestätigen. Weitere Arbeiten deuten darauf hin, dass photothrombotische Infarkte die Expression von Glutamaterezeptoren (*NMDAR*, *mGluR3*, *mGluR2*) verändern [229, 230]. Auch diese Befunde ließen sich nach SD nicht beobachten.

Diese Beispiele stellen sehr deutlich heraus, dass offenbar nur ein Teil der bisher SD zugeschriebenen molekularen Veränderungen nach fokalen Ischämien wirklich auf SD bzw. PID zurückzuführen sind. Ein Erklärungsansatz für diese Diskrepanz sticht besonders hervor: Alle Studien fokaler Ischämien verwenden gesunde Tiere als Kontrolle. Sehr wahrscheinlich besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen den nach PT beobachteten ipsilateralen Veränderungen, welche sich durch die vorliegende Studie nicht auf SD zurückführen lassen, und der Läsionierung des Hirngewebes *per se*. Dieses Thema wurde bereits in einem der vorangegangenen Abschnitte diskutiert. Tieferer Einblick in diese Problematik kann nur durch zukünftige Studien gewonnen werden, in denen gesundes Hirn systematisch mit läsioniertem (3 M NaCl) und läsioniertem + SD (3 M KCl) Hirn verglichen wird.

Hippocampale Neurogenese und räumliches Lernen

Im zweiten Teilprojekt dieser Studie wurden die Auswirkungen kortikaler SD auf die Neurogenese im adulten Gyrus dentatus untersucht. Um einen direkten Vergleich zu rein kortikalen Infarkten zu ermöglichen, wurden Proliferation und Überleben neugeborener Zellen auch nach photothrombotischen Läsionen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass SD zu einer drastischen Steigerung der Neurogenese in der subgranulären Zone führen, dass diese Zellen hauptsächlich zu Neuronen differenzieren und dass sich auch 6 Wochen später noch erheblich mehr neugeborene

Nervenzellen im Gyrus dentatus von SD- als von Kontrollratten finden lassen. SD erhöhten die Anzahl neugeborener Neurone jedoch nicht allein durch eine gesteigerte Proliferation, sondern propagierten zusätzlich die neuronale Differenzierung. Bei Vorbehandlung der Tiere mit dem NMDA-Rezeptorblocker MK-801 verblieb die Neurogeneserate nach 2-stündiger Applikation von 3 M KCl auf dem Level der Kontrollen. Demgegenüber wurde nach photothrombotischen Infarkten (PT) nur eine geringe Steigerung der Proliferation nachgewiesen. Dieser Effekt war transient, langfristig gab es keine Zellzahlunterschiede zwischen PT- und Kontrolltieren.

Im dritten Teilprojekt wurde der Effekt von SD auf das räumliche Lernen analysiert. Dazu wurden SD- und Kontrollratten in der 6. Woche nach dem Eingriff im Morris water maze trainiert. Dabei gab es keine gravierenden Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. SD-Tiere erlernten die Aufgabe zwar tendenziell schneller, die langfristige Gedächtnisleistung war jedoch unbeeinflusst.

Die Entdeckung, dass im Gehirn adulter Säugetiere kontinuierlich neue Nervenzellen gebildet werden, gab den Anstoß, endo- und exogene Modulatoren dieser adulten Neurogenese und deren physiologische Funktion zu entschlüsseln. Daran knüpft sich die Erwartung, die Neurogenese gezielt beeinflussen zu können und damit ein therapeutisches Werkzeug zur kausalen Behandlung neurologischer Erkrankungen in die Hand zu bekommen. Zu den bis dato identifizierten Modulatoren gehören beispielsweise eine reizreiche Umgebung, physische Aktivität, das Alter, Stress, oder eine Verletzung bzw. neurologische Erkrankung des Gehirns (Schädel-Hirn-Trauma, Epilepsie, ischämische Infarkte, etc.) [231]. Allmählich beginnt man die grundlegenden Mechanismen, die zu adulter Neurogenese führen zu verstehen. Eine herausragende Rolle scheint der „neurogenen Permissivität“ des Gewebes zuzukommen. So wurde unlängst entdeckt, dass auch andere Hirnregionen außer der subventrikulären und subgranulären Zone neuronale Stamm- und Vorläuferzellen enthalten, obwohl dort niemals adulte Neurogenese beobachtet wurde (nicht-neurogen). Aus diesen Zellen lassen sich *in vitro* unter geeigneten Kulturbedingungen nicht nur Glia-, sondern auch Nervenzellen heranziehen [232]. Transplantiert man diese Zellen in eine neurogene Region wie die subgranuläre Zone, können sie auch dort zu Glia oder Neuronen differenzieren [233, 234]. Somit stellt sich natürlich die entscheidende Frage, was eine neurogene von einer nicht-neurogenen Hirnregion unterscheidet. Man kam zu dem Konzept der „neurogenen Permissivität“ - eine Stamm- bzw. Vorläuferzelle mag zwar das Potential zur neuronalen Differenzierung innehaben, deren Umsetzung wird jedoch maßgeblich durch das sie umgebende „*Microenvironment*“ bestimmt

(Ortsspezifität). Zu den dieses Mikrogefüge definierenden Faktoren gehören Astrozyten, Blutgefäße („*vascular niche*“), und unreife PSA⁺ Neurone [235, 236]. Die oben aufgeführten Modulatoren greifen vermutlich durch Modifikation dieses „*Microenvironments*“ in die adulte Neurogenese ein. Dabei spielen vermutlich Neurotransmitter (neuronale Aktivität), Wachstumsfaktoren, Neurotrophine, Hormone, u.a. Faktoren eine Rolle [231, 237, 238].

Kortikale SD steigern die hippocampale Neuroneogenese – Spekulationen zum Mechanismus der Infarkt-vermittelten Neurogenese

Da SD ein Epiphänomen einiger der oben genannten neurologischen Erkrankungen sind, war es nahe liegend anzunehmen, dass sie auch zu einer Aktivierung von Neurogenese führen. Bisher liegt nur eine Untersuchung zu diesem Thema vor [239]. Yanamoto *et al.* konnten zeigen, dass eine 48-stündige KCl-Injektion ins Vorderhirn der Ratte die Zellproliferation als auch den Anteil neuronaler Vorläuferzellen in der subventrikulären Zone und im rostralen Migrationsstrom erhöht. Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich daher auf die hippocampale Neurogenese. Im Einklang mit der Arbeitshypothese steigerten SD die ipsi-, aber auch kontralaterale Neurogenese im Hippocampus. Überraschend war die Immensität des Effektes – die Proliferation im ipsilateralen Gyrus dentatus von SD-Tieren übertraf die der Kontrollen um bis zu 470% (d4). Auch 6 Wochen nach SD befanden sich noch circa 270% mehr neugebildete Zellen im ipsilateralen Gyrus dentatus der SD-Ratten als von Kontrollen. Zu diesem Zeitpunkt waren die meisten der neugebildeten Zellen in die Körnerzellschicht eingewandert und zu Neuronen differenziert. Eine Aktivierung der Neurogenese dieses Ausmaßes entspricht in etwa den Beobachtungen nach einem durch MCAO verursachten Infarkt [240].

Nun stellte sich die Frage, ob dieser durch 3 M KCl verursachte Effekt tatsächlich durch kortikale SD oder durch in den Hippocampus diffundierendes KCl und möglicherweise dort ausgelöste SD verursacht wurde. Um dies zu klären, wurde eine Gruppe von Ratten mit dem nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptorantagonisten **MK-801** vorbehandelt, eine Substanz, von der man weiß, dass sie SD blockiert [28]. Damit ließ sich der proliferative Effekt des 3 M KCl unterdrücken. In einer anderen Gruppe von Tieren wurde zusätzlich das hippocampale DC-Potential abgeleitet, welches auch eine Stunde über die KCl-Applikation hinaus keine Deflektionen aufwies. Gemeinsam festigten diese beiden Kontrollen die These, dass die beobachtete Steigerung der Neurogenese kein direkter K⁺-Effekt oder ein Effekt hippocampaler SD ist, sondern dass vielmehr tatsächlich ein kausaler Zusammenhang zwischen kortikalen SD und hippocampaler Neurogenese besteht. Es kann natürlich

nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass zu einem noch späteren Zeitpunkt hippocampale SD entstanden, dies erscheint jedoch eher unwahrscheinlich.

Allerdings erlauben die MK-801-Daten keine Schlüsse bezüglich des Mechanismus der SD-vermittelten Neurogenese. Es existiert eine Reihe von Studien, die sich mit der Funktion von Glutamat-, und im speziellen der von NMDA-Rezeptoren für die hippocampale Neurogenese beschäftigen. Konsens besteht darin, dass NMDA-Rezeptoren in die Regulation hippocampaler Neurogenese involviert sind. Abhängig vom physiologischen Zustand des Organismus scheint ihre Aktivierung (bzw. Hemmung) jedoch diametrale Folgen zu haben: In naiven Tieren führt die NMDA-Rezeptoraktivierung zu einer Hemmung und die NMDA-Rezeptorblockade zur einer Steigerung der hippocampalen Neurogenese [241-243]. Demgegenüber unterdrückt die NMDA-Rezeptorblockade eine durch globale oder fokale Ischämie induzierte Neurogenese [240, 244]. Eine plausible Erklärung dieser Diskrepanz ist bis dato nicht gelungen, diskutabel wäre jedoch, dass die NMDA-Rezeptorblockade im naiven und ischämischen Gehirn auf unterschiedlichen Ebenen angreift. Es gibt Hinweise, dass die NMDA-Rezeptoren, welche die basale Neurogenese regulieren, eher proximal³ (im Hippocampus, möglicherweise direkt auf Stamm- oder Vorläuferzellen) sitzen und für die Suppression der hippocampalen Neurogenese verantwortlich sind. Demgegenüber wird die Neurogenese-hemmende Wirkung von NMDA-Rezeptorantagonisten nach Ischämie vermutlich eher indirekt, durch Blockade distal sitzender Rezeptoren, vermittelt (z.B. auf Astrozyten oder Neuronen im Hippocampus, wo es zur Modifikation Neurogenese-relevanter Wachstumsfaktorlevel kommen kann; oder im Kortex). Im Hinblick auf die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnte sich folgendes Szenario ergeben: Nach Ischämie treten repetitive PID auf, welche zumindest partiell (über Wege, die später diskutiert werden sollen) für die gesteigerte Neurogenese verantwortlich sind. Die Applikation von NMDA-Rezeptorantagonisten wie MK-801 führt zu einer Inhibition der kortikalen PID, wodurch die hippocampale Neurogenese auf ihrem normalen Level verbleibt. Diese Hypothese kann anhand der vorliegenden Daten nicht verifiziert werden, stellt jedoch einen interessanten und simplen Erklärungsansatz für die auf den ersten Blick konträren Effekte der NMDA-Rezeptorblockade auf die Neurogenese im Gyrus dentatus unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen (Ischämie) dar.

Bislang existiert nur eine Studie, die sich mit der Rolle von NMDA-Rezeptoren für die aktivitätsbedingte Neurogenese beschäftigte. In dieser zeigten Kitamura *et al.* [245], dass die in

³die Begriffe proximal und distal werden hier bezüglich der räumlichen Lage der NMDA-Rezeptoren relativ zu den Stamm- bzw. Vorläuferzellen in der subgranulären Zone gebraucht

Wildtyp (WT)-Mäusen durch Lauftraining induzierbare Neurogenese in NR2A ($\epsilon 1$)^{-/-}-Mäusen unterdrückt wird. Gleichzeitig beobachteten sie eine Lauftraining-induzierte Erhöhung der BDNF-Expression im Hippocampus der WT-Mäuse, aber nicht in den NR2A^{-/-}-Tieren. Demgegenüber entsprachen basale Neurogenese und BDNF-Expression in NR2A^{-/-}-Mäusen denen der Kontrollen. Die Autoren schlussfolgerten, dass das Lauftraining in gesunden Tieren durch Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zu einer gesteigerten BDNF-Produktion führt, welche wiederum die Neurogenese aktiviert. In ihren Daten sahen sie einen Widerspruch zu den oben aufgeführten Studien, die zeigten, dass die physiologische Neurogenese durch Blockade von NMDA-Rezeptoren gesteigert wird. Dieser scheint jedoch auf Basis des derzeitigen Kenntnisstandes nicht begründet, die Daten demonstrieren lediglich die Funktion einer einzelnen NMDA-Rezeptoruntereinheit. Außerdem ist bekannt, dass der *Knock Out* eines Gens oft zu kompensatorischen Regulationen verwandter Moleküle führt. Möglich wäre auch, dass ganz unterschiedliche NMDA-Rezeptoren (NR1/NR2A, NR1/Nr2B, etc.), die sich auch durch eine distinkte räumliche Verteilung im Hippocampus auszeichnen [246, 247], in die Regulation der Neurogenese unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen involviert sind. Die Balance zwischen deren Aktivierung und Inaktivierung mag zu den unterschiedlichen Reaktionen der hippocampalen Neurogenese führen. Falls der in der Studie von Kitamura *et al.* vorgeschlagene Mechanismus jedoch auf die Ischämie übertragbar wäre, müssten andere Faktoren als PID/SD als zugrunde liegender Mechanismus angenommen werden.

Die vorangegangenen Erläuterungen führen zur Frage, über welche Wege und **Mechanismen** kortikale SD die hippocampale Neurogenese beeinflussen. Die wichtigste afferente Verbindung zwischen Kortex und Gyrus dentatus ist der vom entorhinalen Kortex ausgehende *Tractus perforans*. Anzunehmen ist, dass dieser durch die massive Depolarisation des ipsilateralen Kortex während einer SD aktiviert wird. Wernsmann *et al.* [248] wiesen elektrophysiologisch nach, dass kortikale SD zu einer gesteigerten hippocampalen Aktivität führen. Denkbar wäre, dass der gesteigerte elektrische Input direkt auf die Neurogenese im Gyrus dentatus einwirkt, wahrscheinlicher ist jedoch, dass es infolgedessen zu einer Synthese und Freisetzung verschiedener Neurotrophine oder anderer Faktoren kommt. Für die letztgenannte Hypothese spricht, dass die Aktivierung des *Tractus perforans* zu einer Heraufregulation der für BDNF und NGF kodierenden mRNAs in den Körnerzellen des ipsilateralen Gyrus dentatus führt [249]. Auch nach kortikalen SD wurde eine Expression von neurotrophen Faktoren wie BDNF im Gyrus dentatus beobachtet [250]. Eine aktuelle, auf der letztjährigen SfN-

Tagung vorgestellte Studie bot eine alternative Hypothese. Die Autoren zeigten, dass eine durch viralen Gentransfer induzierte BDNF-Überexpression im entorhinalen Kortex *per se* ausreichend ist, die hippocampale Neurogenese zu erhöhen [251]. Aus eigenen und anderen Studien ist bekannt, dass SD die BDNF-Expression im ipsilateralen Kortex erhöht. Die Überprüfung dieser Hypothesen erfordert zusätzliche tierexperimentelle Studien. Denkbar wäre eine Läsionierung des *Tractus perforans* vor Induktion der SD (Tage/Wochen), um mögliche alternative Routen der Kommunikation zwischen kortikaler SD und Hippocampus zu identifizieren bzw. die vorgeschlagene Route über selbigen zu bestätigen. Andererseits wäre vorstellbar, gezielt die Heraufregulation von BDNF im entorhinalen Kortex nach SD zu blocken (z.B. durch viralen Gen-*knock down* mit RNAi, DNA-Methylierung).

Die kontralaterale Steigerung der Neurogenese im Gyrus dentatus der SD-Ratten wird vermutlich über transkallosale oder kommissurale Verbindungen zwischen ipsi- und kontralateralem Gyrus dentatus vermittelt. Möglich, jedoch weniger wahrscheinlich wäre auch die Freisetzung endokriner Faktoren.

Neuere Studien wiesen eine Koinzidenz von Neurogenese und programmiertem Zelltod in den neurogenen Zonen des adulten Gehirns nach [118]. Dabei ist jedoch nicht geklärt, inwieweit die adulte Neurogenese kontinuierlich neue Nervenzellen zur Körnerzellschicht des Gyrus dentatus hinzufügt oder Teil eines Austauschprozesses alter Neurone ist. Für beide Theorien lassen sich in der Literatur Argumente finden: Beispielsweise zeigten longitudinale Studien an der Maus einen Zuwachs an Körnerzellen bzw. Volumen der Körnerzellschicht während des ersten Lebensjahres [252, 253]. Die Untersuchungen zum programmierten Zelltod sprechen jedoch dafür, dass neben der Neubildung auch eine Elimination von Körnerzellen stattfindet. Kürzlich zeigten Silva *et al.*, dass es in der Körnerzellschicht von Ratten eine graduelle Verteilung apoptotischer Zellen mit der größten Inzidenz in der äußeren Schicht gibt [254]. Dies lässt einen kontinuierlichen Turnover von Körnerzellen von innen (Neurogenese) nach außen (Apoptose) vermuten.

Um herauszufinden, ob SD *per se* zu einer gesteigerten **Apoptose** führen oder ob die neu gebildeten Zellen im Gyrus dentatus vermehrt apoptotisch eliminiert werden, wurden Immunfärbungen gegen aktivierte Caspase-3 und BrdU durchgeführt. Weder im ipsi- noch kontralateralen Gyrus dentatus oder zerebralen Kortex konnte Caspase-3-Aktivität nachgewiesen werden. Nur im Bereich der Läsionen von SD- und Kontrolltieren fanden sich stark immunreaktive Zellen. Aus den Daten lässt sich schlussfolgern, dass SD grundsätzlich nicht zum Zelluntergang durch klassische Apoptose führen und dass die neu gebildeten oder andere Neurone im Gyrus dentatus nicht über diesen Mechanismus

eliminiert werden. Daneben besteht jedoch die Möglichkeit, dass Zellen durch Caspase-unabhängige Prozesse des programmierten Zelltodes oder durch Nekrose eliminiert werden. Gemäß der im vorigen Absatz genannten Studien erscheint dies zumindest in der Körnerzellschicht wahrscheinlich. Um den Anteil dieser alternativen Zelltodmechanismen abzuklären, sind weitere Untersuchungen notwendig (TUNEL-Assay, Fluor Jade-Färbung).

Ein kleineres Teilprojekt beschäftigte sich mit dem Einfluss kleiner photothrombotischer Infarkte (PT) auf die Neurogenese im Hippocampus. Die Auswirkungen waren marginal und kurzfristig – die Proliferation der Vorläuferzellen in der subgranulären Schicht war am Tag 4 nach PT ipsilateral um etwa 30 % erhöht, die neu gebildeten Zellen überlebten jedoch nicht. Bereits Kluska *et al.* untersuchten den Effekt rein kortikaler Infarkte auf die Neurogenese in dieser Region. Sie fanden 4 und 10 Wochen nach einer PT etwa 40% mehr neugeborene Zellen im DG als in den scheinoperierten Kontrolltieren [255], dies konnte auf ein gesteigertes Überleben neuer Zellen zurückgeführt werden. Die Autoren untersuchten jedoch nicht die unmittelbaren Effekte von PT, außerdem nutzten sie ein alternatives BrdU-Injektionsschema. Dies könnte die Unterschiede zur vorliegenden Studie zumindest partiell erklären. Andererseits stellt sich für beide Studien die Frage, warum PT nur so geringen Einfluss auf die hippocampale Neurogenese ausüben, wo doch bekannt ist, dass auch PT mit PID/SD einhergehen können [72]. Antwort darauf können die Faktoren geben, die während eines operativen Eingriffs SD beeinflussen können. Zum einen sind SD temperaturabhängig – bei niedrigeren Temperaturen sinkt die Anzahl der auslösbaren SD pro Zeiteinheit [20, 256, 257]. Andererseits haben Art und Tiefe der Anästhesie einen Einfluss auf SD [258]. Beide Parameter unterscheiden sich zwischen der Arbeit von Dietrich *et al.* [72] und der vorliegenden PT-Studie, als auch zwischen SD- und PT-Studie dieser Arbeit. Dietrich *et al.* zeichneten den kortikalen Blutfluss und die K⁺-Umverteilung über 3 Stunden nach PT bei 37°C auf. Demgegenüber blieben die Tiere in der vorliegenden Studie maximal 30 Minuten nach PT temperaturkontrolliert, anschließend wurden sie in ihren Käfig zurückgesetzt, wo ihre Körpertemperatur infolge der Inaktivität etwas gesunken sein könnte. Die in den Studien verwendeten 2 %-igen Halothan- oder Isoflurannarkosen wirken sich nachweislich nicht unterschiedlich auf SD aus [258]. Allerdings wurden die Eingriffe zur Auslösung der SD bei einer niedrigeren Narkose durchgeführt als die Infarktinduktionen (1.5 % vs. 2 % Isofluran). Für die Argumentation der fehlenden PID/SD in den getesteten PT-Tieren sprechen auch die Immunfärbungen gegen Cox-2. In der vorliegenden Studie kam es nicht zu der von anderen Autoren [227] beschriebenen ipsilateralen Heraufregulation von Cox-2 nach PT (ohne Abb.), während dies in

SD-Tieren der Fall war (Abb. 12). Zusammenfassend kann der PT-Effekt nicht abschließend beurteilt werden, möglicherweise spielt hier die Temperaturdifferenz zwischen den Studien eine Rolle. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnte die Überwachung von EEG und physiologischer Parameter nach den Eingriffen an den wachen Tieren und für mehrere Stunden nützlich sein.

Die kortikale Läsion per se – (k)ein Modulator hippocampaler Neurogenese?

Aufgrund der Arbeit von Muramatsu *et al.* [221] und den in der vorliegenden Studie gewonnenen Daten zur hippocampalen Neurogenese stellt sich die Frage, welchen Einfluss die Läsionierung des Kortex *per se* auf das verbleibende Hirn ausübt. Im Hinblick auf die Genexpression und einen möglichen Ischämietoleranz-induzierenden Effekt wurden bereits in vorangehenden Abschnitten entsprechende Diskussionen geführt. Dazu lässt sich an dieser Stelle nochmals kurz zusammenfassen, dass Muramatsu *et al.* zeigten, dass eine durch 5 M NaCl ausgelöste kortikale Läsion neuroprotektiv gegenüber einem anschließenden ipsilateralen Infarkt wirkt. Bisherige Studien, inklusive der vorliegenden, die sich histologischer Methoden bedienten, konnten jedoch für die analysierten Genprodukte keinen Unterschied zwischen ipsi- und kontralateralem Kortex in den NaCl-Kontrolltieren nachweisen (außer an der Läsionsstelle). Somit bleibt offen, wodurch dieser läsionsinduzierte neuroprotektive Effekt vermittelt wird.

Andererseits deutet die vorliegende Studie darauf hin, dass eine kortikale Läsion allein keinen Einfluss auf die Neurogenese im Gyrus dentatus hat. Nur in Kombination mit SD kam es zu einer Steigerung der Proliferation von Vorläuferzellen in diesem Gebiet. Die Anzahl der neugebildeten Zellen im Gyrus dentatus der NaCl-Kontrolltiere entsprach der von unläsionierten Tieren (PT-Kontrollen), obwohl erstere eine kortikale Läsion entwickelten. Auch die PT, deren Volumen zumindest kurz nach dem Eingriff dem der KCl-Läsionen entsprach, beeinflussten die hippocampale Neurogenese kaum. Zwar verursachte NaCl kleinere Läsionen als KCl, dies erklärt jedoch nicht, warum es im Gyrus dentatus dieser Tiere keinerlei proliferative Aktivität gab. Auch Arvidsson *et al.* beobachteten, dass die durch transiente MCAO induzierte hippocampale Neurogenese unabhängig vom Infarktvolumen ist [240]. Gemeinsam lassen die bisherigen Daten die Vermutung zu, dass nach einem Infarkt nicht die Läsionierung, sondern andere Prozesse, wie beispielsweise die SD und eventuell bei bestimmten Ischämie modellen auch die im Hippocampus auftretende Ischämie selbst, für die Modulation der Neurogenese im Gyrus dentatus verantwortlich sind. Dies entspricht dem Konzept, dass die durch einen Infarkt verursachten Reaktionen des Gehirns multifaktoriell bedingt sind.

BrdU als Proliferationsmarker

Die BrdU-Markierung ist derzeit die bevorzugte Methode, um Proliferation und Neurogenese *in vivo* zu analysieren. Nach systemischer Applikation wird BrdU als Thymidin-Analogon in die DNA aller Zellen eingebaut, die DNA synthetisieren. Im Falle von mitoseaktiven Zellen wird es während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA integriert. Dadurch werden nicht nur die zum Zeitpunkt der BrdU-Verfügbarkeit teilungsaktiven Zellen, sondern auch deren Nachkommen gekennzeichnet. Darüber hinaus kann BrdU auch im Zuge von DNA-Reparaturprozessen in postmitotischen Neuronen eingebaut werden. Die daraus resultierende Skepsis gegenüber dieser Methode ließ sich durch neuere Studien ausräumen, die nachwiesen, dass die durch BrdU markierten Zellen im Gehirn tatsächlich durch Zellteilung hervorgegangen sind [259, 260]. Unter anderen können die folgenden Argumente ins Feld geführt werden: 1) wenn BrdU in der in den meisten Studien genutzten Konzentration von 50 mg/kg verwendet wird, wird es in Zonen neurogener Aktivität eingebaut; 2) kurz nach BrdU-Injektion gibt es eine klare Kolo-kalisation mit Proliferationsmarkern wie Ki67 [260]; 3) verfolgt man die BrdU-markierten Zellen über die Zeit, lässt sich deren Entwicklung von Vorläuferzellen ($\text{BrdU}^+/\text{Nestin}^+$) über unreife ($\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+$) bis hin zu reifen Neuronen ($\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$) nachvollziehen [259]; 4) es gibt keine Hinweise auf die Inkorporation von BrdU in reife Neurone unmittelbar nach dessen Applikation. Langfristig spielen zwei Probleme eine Rolle. Zum einen kann das BrdU in einer stark teilungsaktiven Population ausgedünnt und damit undetektierbar werden, andererseits kommt es durch die Größe des Bromid-Ions zu Veränderungen der DNA-Struktur, was eine veränderte Genexpression oder erhöhte Kanzerogenität hervorrufen kann. Dies spielt jedoch in der vorliegenden wie in den meisten anderen Studien, in denen es sich um Analysezeiträume von Tagen bis maximal einigen Monaten handelt, eine zu vernachlässigende Rolle.

Funktionelle Relevanz der gesteigerten Neurogenese im Gyrus dentatus

Es stellt sich die Frage, ob die massive Steigerung der Neurogeneserate in einer Struktur, die im Zusammenhang mit Lern- und Gedächtnisleistungen steht, sich positiv auf bestimmte Verhaltensweisen auswirken kann. In der vorliegenden Studie wurde die kognitive Leistung der SD-Ratten in zwei Varianten des Morris Water Maze evaluiert. Dieser Test gilt als experimentelles Paradigma für hippocampusabhängige Lernvorgänge. In keinem der beiden Tests konnten Unterschiede in der Gedächtnisleistung von SD- relativ zu Kontrolltieren festgestellt werden (*probe trials*). Demgegenüber zeigten SD-Ratten eine tendenziell bessere Lernleistung über die gesamte

Akquisitionsphase des traditionellen Water Maze hinweg. Dieser Unterschied war in einigen Versuchsdurchgängen signifikant. Unter Berücksichtigung des Befundes, dass die Lernleistung der SD-Tiere nur marginal über der der Kontrollen lag und sich die signifikanten Unterschiede nicht über eine längere Testperiode hielten, können die Daten dahingehend interpretiert werden, dass SD bzw. die große Anzahl neu gebildeter Neurone nicht zu einer relevanten Verbesserung der kognitiven, im Morris Water Maze evaluierbaren Leistungen führen.

Nach wie vor ist unklar, welche funktionelle Relevanz die adulte Neurogenese im Hippocampus besitzt. In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Studien durchgeführt, die sich mit diesem Thema beschäftigten (2-7). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die in einer reizreichen Umgebung (*Enriched Environment*) lebten, besser in räumlichen Tests, wie dem Morris Water Maze abschnitten [261] und weniger Angstverhalten zeigten [262], als unter Standardbedingungen gehaltene Kontrolltiere. Gleichzeitig führte das *Enriched Environment* zu einer gesteigerten hippocampalen Neurogenese [136, 261]. Andere Versuche, die sich dem Zusammenhang zwischen hippocampaler Neurogenese und bestimmten Verhaltensweisen widmeten, schlossen sich an. In diesen Studien wurde die adulte Neurogenese durch systemische Gabe von Zytostatika [131] oder Röntgenbestrahlung des Gehirns [128, 129, 263] ausgeschaltet. Dies resultierte in einer Verschlechterung der Tiere in einigen hippocampus-abhängigen Lernparadigmen (*trace conditioning* [130], räumliches Lernen im Barnes Maze [129]), während andere unbeeinträchtigt blieben (räumliches Lernen im Morris Water Maze [129, 131]). Andererseits wurde eine durch intraventrikuläre S100 β -Injektion erhöhte hippocampale Neurogenese mit einer gesteigerten Leistung im Morris Water Maze in Verbindung gebracht [264]. Aufgrund dieser und anderer Ergebnisse wurde vermutet, dass die adulte hippocampale Neurogenese für bestimmte Hippocampus-abhängige Verhaltensweisen erforderlich ist. All diese Studien konnten jedoch keinen direkten Beweis dieser Hypothese erbringen – die *Enriched Environment*-Daten zeigen eine Koinzidenz, aber keine Korrelation von Neurogenese und verändertem Verhalten, in den Zytostatika- und Bestrahlungsstudien wurde die mitotische Aktivität nicht nur im Hippocampus, sondern auch in anderen Hirnregionen blockiert. Dementsprechend wären auch alternative Routen, als physiologisches/anatomisches Korrelat der beobachteten Verhaltensänderungen denkbar (Modulation von Wachstumsfaktoren, der Angiogenese, synaptische Plastizität, etc.).

Eine kürzlich in *Nature Neuroscience* publizierte Studie testete die Hypothese, dass adulte hippocampale Neurogenese die Effekte einer reizreichen Umgebung vermittelt [265]. Durch fokale

Röntgenbestrahlung wurde selektiv nur die hippocampale Neurogenese ausgeschaltet. Zwei Monate später wurden die Mäuse in zwei Gruppen gesplittet, wovon eine von nun an in einer reizreichen Umgebung, die andere weiterhin unter Standardbedingungen gehalten wurde. Sechs Wochen später wurden Angstverhalten und räumliches Lernen getestet, eine Woche nach dem letzten Verhaltenstest wurden teilungsaktive Zellen durch systemische BrdU-Injektion markiert. Die Autoren konnten zeigen, dass das *Enriched Environment* in gesunden Mäusen zu dem erwarteten Anstieg hippocampaler Neurogenese führte, während in bestrahlten Tieren keinerlei Teilungsaktivität beobachtet wurde. Außerdem zeigten die in der reizreichen Umgebung gehaltenen gesunden Kontrolltiere ein vermindertes Angstverhalten und ein besseres Lernvermögen im Morris Water Maze als die unter Standardbedingungen gehaltenen Mäuse. Überraschenderweise schnitten die im *Enriched Environment* gehaltenen bestrahlten Tiere genauso gut in diesen Tests ab, wie die unter gleichen Bedingungen gehaltenen unbestrahlten Kontrollen. Diese Studie verdeutlicht, dass andere Faktoren und nicht die hippocampale Neurogenese für die durch *Enriched Environment* hervorgerufenen Verhaltensänderungen verantwortlich sein müssen. Sie schließt jedoch einen Zusammenhang zwischen hippocampaler Neurogenese und anderen Lern- bzw. Verhaltensformen nicht aus. Andererseits wäre auch denkbar, dass die hippocampale Neurogenese unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen unterschiedliche Funktionen hat.

Die Interpretation der derzeit existierenden Daten zu diesem Thema bleibt also hochgradig spekulativ, ein Zusammenhang zwischen hippocampaler Neurogenese und Hippocampus-abhängigen Verhaltensweisen konnte bisher nicht schlüssig nachgewiesen werden. Dies erfordert weitere Untersuchungen, die ganz gezielt die hippocampale Neurogenese modulieren und deren Einfluss auf die kognitive Leistung untersuchen. Denkbar wäre, dass systematische longitudinale Analysen zu einem besseren Verständnis führen, da für die Übernahme einer bestimmten Funktion durch neue Neurone vermutlich sensible Zeitfenster existieren [128]. Deren Existenz würde auch die zum Teil sehr unterschiedlichen Resultate der bisherigen Studien erklären. Für die Fortführung der vorliegenden Arbeit böte sich durch Änderung des Zeitfensters zwischen SD und kognitivem Test eine Möglichkeit, eventuell SD-bedingte Verhaltensänderungen zu detektieren. Auch die Verwendung anderer Tests könnte sich als sinnvoll erweisen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die erstmals von Leao beschriebene kortikale Spreading Depression (SD) ist ein elektrophysiologisches Phänomen, welches im Zusammenhang mit der Pathophysiologie der Migräneaura und des Schlaganfalls diskutiert wird. Inwiefern die während einer fokalen zerebralen Ischämie auftretenden SD-ähnlichen Periinfarktdepolarisationen (PID) kausal an den nachfolgend in periläsionellen Hirngebieten beobachteten Ereignissen beteiligt sind, ist unklar. Man weiß, dass PID im Tierexperiment zur sekundären Expansion des infarzierten Gewebes auf Kosten der Penumbra beitragen. Darüberhinaus ist ungeklärt, ob und wie sie Struktur und Funktion des nicht-ischämischen *remote* Kortex beeinflussen. Die vorliegende Studie befasste sich daher primär mit solchen Aspekten von SD, die für das Verständnis der Pathophysiologie dieser Erkrankungen förderlich sein könnten. Eine systematische Analyse der durch SD modifizierten Prozesse im normoxischen Gehirn kann überdies Aufschluss darüber geben, welche molekularen Veränderungen für die Induktion einer Ischämietoleranz durch SD verantwortlich sind, möglicherweise bieten sich hier neue Ansatzpunkte für die Entwicklung neuroprotektiver Therapiekonzepte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einerseits die molekularen Konsequenzen von SD im Kortex der ipsilateralen Hemisphäre aufzuklären, andererseits sollte der Einfluss kortikaler SD auf die hippocampale Neurogenese und die Lern- und Gedächtnisleistung analysiert werden. Repetitive SD wurden in Ratten *in vivo* durch 2-stündige epidurale Applikation von 3 M KCl induziert, Kontrolltieren wurde equimolares NaCl appliziert.

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass SD zu einer massiven differentiellen Genexpression im ipsilateralen Kortex führen. Hauptsächlich waren etwa 12 funktionelle Kategorien von Genen betroffen: *Immediate Early* Gene bzw. Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktion, Transport, Metabolismus, Stressreaktion, Kommunikation und synaptische Transmission, Zelladhäsion und Membran, Wachstum und Differenzierung, Zytoskelett, extrazelluläre Matrix, Immunantwort/Inflammation und Zellzyklus. Die Expression dieser Gene folgte einem spezifischen zeitlichen Muster, wobei die meisten Veränderungen innerhalb der ersten 24 Stunden, wenige jedoch auch nach Tagen bis Wochen auftraten.

Das zweite Projekt beschäftigte sich mit dem Einfluss von SD auf die adulte hippocampale Neurogenese. Hier wurde gezeigt, dass kortikale SD zu einer massiven Proliferation endogener

Stamm- bzw. Vorläuferzellen im ipsilateralen Gyrus dentatus führen und gleichzeitig die neuronale Differenzierung begünstigen. Zur Absicherung dieses Befundes wurden zwei Kontrollgruppen eingeschlossen, in denen SD entweder pharmakologisch geblockt oder das hippocampale DC-Potential abgegriffen wurde(n). Die Inhibition der SD durch Verabreichung des NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 resultierte in einer Stagnation der hippocampalen Neurogenese auf dem Level der Kontrolltiere. Außerdem gab es keine elektrophysiologischen Hinweise für das Auftreten von SD im Hippocampus. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass die Beobachtungen im Gyrus dentatus tatsächlich auf die kortikalen SD zurückzuführen sind. Die immunhistochemische Analyse der Caspase-3 Aktivität zeigte, dass die gesteigerte Neurogenese im Gyrus dentatus nicht mit einem erhöhten Absterben von Zellen durch klassische Apoptose einherging.

Die Applikation der hyperosmolaren Salzlösungen führte zur Entstehung kleiner kortikaler Läsionen. Dabei zeigten nur die SD-Tiere eine gesteigerte Neurogenese im Vergleich mit unläsionierten Kontrollratten. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Größe einer kortikalen Läsion nicht mit einer gesteigerten hippocampalen Neurogenese korreliert, im Gegenteil greifen kleine kortikale Läsionen *per se* nicht modulatorisch in die Neurogenese im Gyrus dentatus ein.

Zur Untersuchung der langfristigen funktionellen Konsequenzen kortikaler SD wurden die Tiere in zwei Varianten des Morris Water Maze getestet. In keinem dieser Tests führten SD zu einer relevanten Verbesserung der Lern- oder Gedächtnisleistung.

Die vorliegende Studie zeigt erstmals, dass kortikale SD zu einer massiven und zum Teil langfristigen Modifikation der ipsilateralen Genexpression und einer verstärkten Neurogenese im Gyrus dentatus adulter Ratten führen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die SD-ähnlichen Perinfarktdepolarisationen erheblich zu den periläsionellen strukturellen und funktionellen Veränderungen nach einem Schlaganfall beitragen können und dementsprechend den Prozess der Funktionsrestitution und Plastizität maßgeblich beeinflussen können.

REFERENZEN

1. Leao AAP, *Spreading depression of activity in the cerebral cortex*. J Neurophysiol, 1944. 7: p. 359-90.
2. Lledo PM, Alonso M, and Grubb MS, *Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits*. Nat Rev Neurosci, 2006. 7(3): p. 179-93.
3. Lu XC, Williams AJ, Yao C, Berti R, Hartings JA, Whipple R, Vahey MT, Polavarapu RG, Woller KL, Tortella FC, and Dave JR, *Microarray analysis of acute and delayed gene expression profile in rats after focal ischemic brain injury and reperfusion*. J Neurosci Res, 2004. 77(6): p. 843-57.
4. Pfaffl MW, *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. 29(9): p. e45.
5. Rother J, [*"Spreading depression" and peri-infarct depolarizations. Relevant pathological events in migraine and stroke?*]. Nervenarzt, 2000. 71(2): p. 84-90.
6. Leao AAP, *Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex*. J Neurophysiol 1947. 10: p. 409–414.
7. Kury P, Schroeter M, and Jander S, *Transcriptional response to circumscribed cortical brain ischemia: spatiotemporal patterns in ischemic vs. remote non-ischemic cortex*. Eur J Neurosci, 2004. 19(7): p. 1708-20.
8. Schmidt-Kastner R, Zhang B, Belayev L, Khoutorova L, Amin R, Busto R, and Ginsberg MD, *DNA microarray analysis of cortical gene expression during early recirculation after focal brain ischemia in rat*. Brain Res Mol Brain Res, 2002. 108(1-2): p. 81-93.
9. Kariko K, Harris VA, Rangel Y, Duvall ME, and Welsh FA, *Effect of cortical spreading depression on the levels of mRNA coding for putative neuroprotective proteins in rat brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 1998. 18(12): p. 1308-15.
10. Herrera DG, Maysinger D, Almazan G, Funnel R, and Cuello AC, *Analysis of c-Fos and glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression following topical application of potassium chloride (KCl) to the brain surface*. Brain Res, 1998. 784(1-2): p. 71-81.
11. Gass P, Spranger M, Herdegen T, Bravo R, Kock P, Hacke W, and Kiessling M, *Induction of FOS and JUN proteins after focal ischemia in the rat: differential effect of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801*. Acta Neuropathol (Berl), 1992. 84(5): p. 545-53.
12. Leao AAP, *Pial circulation and spreading depression of activity in the cerebral cortex*. J Neurophysiol 1944. 7: p. 391–396.
13. Leao AAP and Morison RS, *Propagation of spreading cortical depression*. J Neurophysiol, 1945(8).
14. Honkaniemi J, States BA, Weinstein PR, Espinoza J, and Sharp FR, *Expression of zinc finger immediate early genes in rat brain after permanent middle cerebral artery occlusion*. J Cereb Blood Flow Metab, 1997. 17(6): p. 636-46.
15. Lauritzen M, *Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory*. Brain, 1994. 117: p. 199-210.
16. Hossmann KA, *Periinfarct depolarizations*. Cerebrovasc Brain Metab Rev, 1996. 8(3): p. 195-208.
17. Schwarz DA, Barry G, Mackay KB, Manu F, Naeve GS, Vana AM, Verge G, Conlon PJ, Foster AC, and Maki RA, *Identification of differentially expressed genes induced by transient ischemic stroke*. Brain Res Mol Brain Res, 2002. 101(1-2): p. 12-22.
18. Strong AJ, Dreier J, Woitzik J, Bhatia R, Hashemi P, Fuhr SB, Lauritzen M, and Fabricius M, *Cortical spreading depression in patients with acute subarachnoid hemorrhage*. Program No. 358.7. 2005 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2005. Online., 2005.
19. Strong AJ, Fabricius M, Boutelle MG, Hibbins SJ, Hopwood SE, Jones R, Parkin MC, and Lauritzen M, *Spreading and synchronous depressions of cortical activity in acutely injured human brain*. Stroke, 2002. 33(12): p. 2738-43.

20. Bures J, Buresova O, and Krivanek J, *The mechanism and application of Leao's spreading depression of electroencephalographic activity*. New York, Academic Press, 1974.
21. Herdegen T, Sandkuhler J, Gass P, Kiessling M, Bravo R, and Zimmermann M, *JUN, FOS, KROX, and CREB transcription factor proteins in the rat cortex: basal expression and induction by spreading depression and epileptic seizures*. J Comp Neurol, 1993. 333(2): p. 271-88.
22. Somjen GG, *Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization*. Physiol Rev, 2001. 81(3): p. 1065-96.
23. Van Harreveld A and Stamm JS, *Vascular concomitants of spreading cortical depression*. J Neurophysiol, 1952. 15(6): p. 487-96.
24. Grafstein B, *Mechanism of spreading cortical depression*. J Neurophysiol, 1956. 19(2): p. 154-71.
25. Van Harreveld A, *Compounds in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and contraction of crustacean muscle*. J Neurochem, 1959. 3(4): p. 300-15.
26. Van Harreveld A and Fifkova E, *Glutamate release from the retina during spreading depression*. J Neurobiol, 1970. 2(1): p. 13-29.
27. Lauritzen M and Hansen AJ, *The effect of glutamate receptor blockade on anoxic depolarization and cortical spreading depression*. J Cereb Blood Flow Metab, 1992. 12(2): p. 223-9.
28. Willette RN, Lysko PG, and Sauermelch CF, *A comparison of (+)SK&F 10047 and MK-801 on cortical spreading depression*. Brain Res, 1994. 648(2): p. 347-51.
29. Tobiasz C and Nicholson C, *Tetrodotoxin resistant propagation and extracellular sodium changes during spreading depression in rat cerebellum*. Brain Res, 1982. 241(2): p. 329-33.
30. Herreras O and Somjen GG, *Analysis of potential shifts associated with recurrent spreading depression and prolonged unstable spreading depression induced by microdialysis of elevated K⁺ in hippocampus of anesthetized rats*. Brain Res, 1993. 610(2): p. 283-94.
31. Obrenovitch TP and Zilkha E, *High extracellular potassium, and not extracellular glutamate, is required for the propagation of spreading depression*. J Neurophysiol, 1995. 73(5): p. 2107-14.
32. Yoshimura N, Kikuchi T, Kuroiwa S, and Gaun S, *Differential temporal and spatial expression of immediate early genes in retinal neurons after ischemia-reperfusion injury*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. 44(5): p. 2211-20.
33. Nedergaard M, Cooper AJ, and Goldman SA, *Gap junctions are required for the propagation of spreading depression*. J Neurobiol, 1995. 28(4): p. 433-44.
34. Martins-Ferreira H and Ribeiro LJ, *Biphasic effects of gap junctional uncoupling agents on the propagation of retinal spreading depression*. Braz J Med Biol Res, 1995. 28(9): p. 991-4.
35. Kunkler PE and Kraig RP, *Calcium waves precede electrophysiological changes of spreading depression in hippocampal organ cultures*. J Neurosci, 1998. 18(9): p. 3416-25.
36. Kraig RP and Kunkler PE, *Spreading depression: a teleological means for self-protection from brain ischemia*. Cerebrovascular Disease, 22nd Princeton Conference, 2002: p. 142-157.
37. Martins-Ferreira H, Nedergaard M, and Nicholson C, *Perspectives on spreading depression*. Brain Res Brain Res Rev, 2000. 32(1): p. 215-34.
38. Kraig RP and Nicholson C, *Extracellular ionic variations during spreading depression*. Neuroscience, 1978. 3(11): p. 1045-59.
39. Hansen AJ and Zeuthen T, *Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex*. Acta Physiol Scand, 1981. 113(4): p. 437-45.
40. Hansen AJ and Olsen CE, *Brain extracellular space during spreading depression and ischemia*. Acta Physiol Scand, 1980. 108(4): p. 355-65.

41. Van Harreveld A and Khattab FI, *Changes in cortical extracellular space during spreading depression investigated with the electron microscope*. J Neurophysiol, 1967. 30(4): p. 911-29.
42. Gardner-Medwin AR, *Possible roles of vertebrate neuroglia in potassium dynamics, spreading depression and migraine*. J Exp Biol, 1981. 95: p. 111-27.
43. Lian XY and Stringer JL, *Astrocytes contribute to regulation of extracellular calcium and potassium in the rat cerebral cortex during spreading depression*. Brain Res, 2004. 1012(1-2): p. 177-84.
44. Mayevsky A and Weiss HR, *Cerebral blood flow and oxygen consumption in cortical spreading depression*. J Cereb Blood Flow Metab, 1991. 11(5): p. 829-36.
45. Gjedde A, Hansen AJ, and Quistorff B, *Blood-brain glucose transfer in spreading depression*. J Neurochem, 1981. 37(4): p. 807-12.
46. Krivanek J, *Some metabolic changes accompanying Leao's spreading cortical depression in the rat*. J Neurochem, 1961. 6: p. 183-9.
47. Gault LM, Lin CW, LaManna JC, and Lust WD, *Changes in energy metabolites, cGMP and intracellular pH during cortical spreading depression*. Brain Res, 1994. 641(1): p. 176-80.
48. Krivanek J, *Changes of brain glycogen in the spreading EEG-depression of Leao*. J Neurochem, 1958. 2(4): p. 337-43.
49. Mies G and Paschen W, *Regional changes of blood flow, glucose, and ATP content determined on brain sections during a single passage of spreading depression in rat brain cortex*. Exp Neurol, 1984. 84(2): p. 249-58.
50. Mayevsky A, Zeuthen T, and Chance B, *Measurements of extracellular potassium, ECoG and pyridine nucleotide levels during cortical spreading depression in rats*. Brain Res, 1974. 76(2): p. 347-9.
51. Piper RD, Lambert GA, and Duckworth JW, *Cortical blood flow changes during spreading depression in cats*. Am J Physiol, 1991. 261(1 Pt 2): p. H96-102.
52. Lauritzen M, *Long-lasting reduction of cortical blood flow of the brain after spreading depression with preserved autoregulation and impaired CO₂ response*. J Cereb Blood Flow Metab, 1984. 4(4): p. 546-54.
53. Lauritzen M, Jorgensen MB, Diemer NH, Gjedde A, and Hansen AJ, *Persistent oligemia of rat cerebral cortex in the wake of spreading depression*. Ann Neurol, 1982. 12(5): p. 469-74.
54. Krivanek J, *Effects of spreading cortical depression on the incorporation of [¹⁴C]leucine into proteins of rat brain*. J Neurochem, 1970. 17(4): p. 531-8.
55. Mies G, *Inhibition of protein synthesis during repetitive cortical spreading depression*. J Neurochem, 1993. 60(1): p. 360-3.
56. Kawahara N, Ruetzler CA, Mies G, and Klatzo I, *Cortical spreading depression increases protein synthesis and upregulates basic fibroblast growth factor*. Exp Neurol, 1999. 158(1): p. 27-36.
57. Plumier JC, David JC, Robertson HA, and Currie RW, *Cortical application of potassium chloride induces the low-molecular weight heat shock protein (Hsp27) in astrocytes*. J Cereb Blood Flow Metab, 1997. 17(7): p. 781-90.
58. Yanamoto H, Mizuta I, Nagata I, Xue J, Zhang Z, and Kikuchi H, *Infarct tolerance accompanied enhanced BDNF-like immunoreactivity in neuronal nuclei*. Brain Res, 2000. 877(2): p. 331-44.
59. Shen PJ and Gundlach AL, *Differential increases in chromogranins, but not synapsin I, in cortical neurons following spreading depression: implications for functional roles and transmitter peptide release*. Eur J Neurosci, 1998. 10(7): p. 2217-30.
60. Kraig RP, Dong LM, Thisted R, and Jaeger CB, *Spreading depression increases immunohistochemical staining of glial fibrillary acidic protein*. J Neurosci, 1991. 11(7): p. 2187-98.
61. Caggiano AO, Breder CD, and Kraig RP, *Long-term elevation of cyclooxygenase-2, but not lipoxygenase, in regions synaptically distant from spreading depression*. J Comp Neurol, 1996. 376(3): p. 447-62.

62. Yokota C, Inoue H, Kuge Y, Abumiya T, Tagaya M, Hasegawa Y, Ejima N, Tamaki N, and Minematsu K, *Cyclooxygenase-2 expression associated with spreading depression in a primate model*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. 23(4): p. 395-8.
63. Koistinaho J, Pasonen S, Yrjanheikki J, and Chan PH, *Spreading depression-induced gene expression is regulated by plasma glucose*. Stroke, 1999. 30(1): p. 114-9.
64. Rangel YM, Kariko K, Harris VA, Duvall ME, and Welsh FA, *Dose-dependent induction of mRNAs encoding brain-derived neurotrophic factor and heat-shock protein-72 after cortical spreading depression in the rat*. Brain Res Mol Brain Res, 2001. 88(1-2): p. 103-12.
65. Kokaia Z, Gido G, Ringstedt T, Bengzon J, Kokaia M, Siesjö BK, Persson H, and Lindvall O, *Rapid increase of BDNF mRNA levels in cortical neurons following spreading depression: regulation by glutamatergic mechanisms independent of seizure activity*. Brain Res Mol Brain Res, 1993. 19(4): p. 277-86.
66. Matsushima K, Schmidt-Kastner R, Hogan MJ, and Hakim AM, *Cortical spreading depression activates trophic factor expression in neurons and astrocytes and protects against subsequent focal brain ischemia*. Brain Res, 1998. 807(1-2): p. 47-60.
67. Choudhuri R, Cui L, Yong C, Bowyer S, Klein RM, Welch KM, and Berman NE, *Cortical spreading depression and gene regulation: relevance to migraine*. Ann Neurol, 2002. 51(4): p. 499-506.
68. Wiggins AK, Shen PJ, and Gundlach AL, *Atrial natriuretic peptide expression is increased in rat cerebral cortex following spreading depression: possible contribution to sd-induced neuroprotection*. Neuroscience, 2003. 118(3): p. 715-26.
69. Shen PJ, Larm JA, and Gundlach AL, *Expression and plasticity of galanin systems in cortical neurons, oligodendrocyte progenitors and proliferative zones in normal brain and after spreading depression*. Eur J Neurosci, 2003. 18(6): p. 1362-76.
70. Back T, Kohno K, and Hossmann KA, *Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram*. J Cereb Blood Flow Metab, 1994. 14(1): p. 12-9.
71. Nedergaard M and Hansen AJ, *Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 1993. 13(4): p. 568-74.
72. Dietrich WD, Feng ZC, Leistra H, Watson BD, and Rosenthal M, *Photothrombotic infarction triggers multiple episodes of cortical spreading depression in distant brain regions*. J Cereb Blood Flow Metab, 1994. 14(1): p. 20-8.
73. Nedergaard M and Hansen AJ, *Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain*. Brain Res, 1988. 449(1-2): p. 395-8.
74. Mies G, Iijima T, and Hossmann KA, *Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat*. Neuroreport, 1993. 4(6): p. 709-11.
75. Hartings JA, Rolli ML, Lu XC, and Tortella FC, *Delayed secondary phase of peri-infarct depolarizations after focal cerebral ischemia: relation to infarct growth and neuroprotection*. J Neurosci, 2003. 23(37): p. 11602-10.
76. Nimura T, Weinstein PR, Massa SM, Panter S, and Sharp FR, *Heme oxygenase-1 (HO-1) protein induction in rat brain following focal ischemia*. Brain Res Mol Brain Res, 1996. 37(1-2): p. 201-8.
77. Mancuso A, Derugin N, Ono Y, Hara K, Sharp FR, and Weinstein PR, *Transient MRI-detected water apparent diffusion coefficient reduction correlates with c-fos mRNA but not hsp70 mRNA induction during focal cerebral ischemia in rats*. Brain Res, 1999. 839(1): p. 7-22.
78. Plumier JC, Armstrong JN, Wood NI, Bability JM, Hamilton TC, Hunter AJ, Robertson HA, and Currie RW, *Differential expression of c-fos, Hsp70 and Hsp27 after photothrombotic injury in the rat brain*. Brain Res Mol Brain Res, 1997. 45(2): p. 239-46.
79. Kinoshita Y, Ueyama T, Senba E, Terada T, Nakai K, and Itakura T, *Expression of c-fos, heat shock protein 70, neurotrophins, and cyclooxygenase-2 mRNA in response to focal cerebral ischemia/reperfusion in rats and their modification by magnesium sulfate*. J Neurotrauma, 2001. 18(4): p. 435-45.

80. Witte OW, Bidmon HJ, Schiene K, Redecker C, and Hagemann G, *Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2000. 20(8): p. 1149-65.
81. Dirnagl U, Iadecola C, and Moskowitz MA, *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view*. Trends Neurosci, 1999. 22(9): p. 391-7.
82. Kawahara N, Ruetzler CA, and Klatzo I, *Protective effect of spreading depression against neuronal damage following cardiac arrest cerebral ischaemia*. Neurol Res, 1995. 17(1): p. 9-16.
83. Yanamoto H, Hashimoto N, Nagata I, and Kikuchi H, *Infarct tolerance against temporary focal ischemia following spreading depression in rat brain*. Brain Res, 1998. 784(1-2): p. 239-49.
84. Kobayashi S, Harris VA, and Welsh FA, *Spreading depression induces tolerance of cortical neurons to ischemia in rat brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 1995. 15(5): p. 721-7.
85. Otori T, Greenberg JH, and Welsh FA, *Cortical spreading depression causes a long-lasting decrease in cerebral blood flow and induces tolerance to permanent focal ischemia in rat brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. 23(1): p. 43-50.
86. Taga K, Patel PM, Drummond JC, Cole DJ, and Kelly PJ, *Transient neuronal depolarization induces tolerance to subsequent forebrain ischemia in rats*. Anesthesiology, 1997. 87(4): p. 918-25.
87. Matsushima K, Hogan MJ, and Hakim AM, *Cortical spreading depression protects against subsequent focal cerebral ischemia in rats*. J Cereb Blood Flow Metab, 1996. 16(2): p. 221-6.
88. Weih M, Prass K, Ruscher K, Trendelenburg G, Dirnagl U, Riepe MW, and Meisel A, *[Ischemia tolerance; model for research, hope for clinical practice?]*. Nervenarzt, 2001. 72(4): p. 255-60.
89. Yanamoto H, Xue JH, Miyamoto S, Nagata I, Nakano Y, Murao K, and Kikuchi H, *Spreading depression induces long-lasting brain protection against infarcted lesion development via BDNF gene-dependent mechanism*. Brain Res, 2004. 1019(1-2): p. 178-88.
90. Lashley K, *Patterns of cerebral integration indicated by scotomas of migraine*. Arch Neurol Psychiatry, 1941. 46: p. 331-339.
91. Milner PM, *Note on a possible correspondence between the scotomas of migraine and spreading depression of Leao*. Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl, 1958. 10(4): p. 705.
92. Leao AA, *Spreading depression*. Funct Neurol, 1986. 1(4): p. 363-6.
93. Bowyer SM, Tepley N, Papuashvili N, Kato S, Barkley GL, Welch KM, and Okada YC, *Analysis of MEG signals of spreading cortical depression with propagation constrained to a rectangular cortical strip. II. Gyrencephalic swine model*. Brain Res, 1999. 843(1-2): p. 79-86.
94. Van Harreveld A, Terres G, and Dernburg EA, *Cortical discontinuity and propagation of spreading depression*. Am J Physiol, 1956. 184(1): p. 233-8.
95. Olesen J, Larsen B, and Lauritzen M, *Focal hyperemia followed by spreading oligemia and impaired activation of rCBF in classic migraine*. Ann Neurol, 1981. 9(4): p. 344-52.
96. Lauritzen M, *Cerebral blood flow in migraine and cortical spreading depression*. Acta Neurol Scand Suppl, 1987. 113: p. 1-40.
97. Lauritzen M, Skyhoj Olsen T, Lassen NA, and Paulson OB, *Changes in regional cerebral blood flow during the course of classic migraine attacks*. Ann Neurol, 1983. 13(6): p. 633-41.
98. Cao Y, Welch KM, Aurora S, and Vikingstad EM, *Functional MRI-BOLD of visually triggered headache in patients with migraine*. Arch Neurol, 1999. 56(5): p. 548-54.
99. Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, Kwong KK, Cutrer FM, Rosen BR, Tootell RB, Sorensen AG, and Moskowitz MA, *Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(8): p. 4687-92.
100. Bowyer SM, Aurora KS, Moran JE, Tepley N, and Welch KM, *Magnetoencephalographic fields from patients with spontaneous and induced migraine aura*. Ann Neurol, 2001. 50(5): p. 582-7.

101. Sramka M, Brozek G, Bures J, and Nadvornik P, *Functional ablation by spreading depression: possible use in human stereotactic neurosurgery*. Appl Neurophysiol, 1977. 40(1): p. 48-61.
102. Gorji A, Scheller D, Straub H, Tegtmeyer F, Kohling R, Hohling JM, Tuxhorn I, Ebner A, Wolf P, Werner Panneck H, Oppel F, and Speckmann EJ, *Spreading depression in human neocortical slices*. Brain Res, 2001. 906(1-2): p. 74-83.
103. Avoli M, Drapeau C, Louvel J, Pumain R, Olivier A, and Villemure JG, *Epileptiform activity induced by low extracellular magnesium in the human cortex maintained in vitro*. Ann Neurol, 1991. 30(4): p. 589-96.
104. Mayevsky A, Doron A, Manor T, Meilin S, Zarchin N, and Ouaknine GE, *Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system*. Brain Res, 1996. 740(1-2): p. 268-74.
105. Fabricius M, Fuhr S, Bhatia R, Boutelle M, Hashemi P, Strong AJ, and Lauritzen M, *Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex*. Brain, 2006. 129(Pt 3): p. 778-90.
106. Schöler HR, *[The potential of stem cells. A status update]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2004. 47(6): p. 565-77.
107. Watt FM and Hogan BL, *Out of Eden: stem cells and their niches*. Science, 2000. 287(5457): p. 1427-30.
108. Allen E, *The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat*. J Comp Neurol 1912. 22: p. J Comp Neurol
109. Altman J, *Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats*. Anat Rec, 1963. 145: p. 573-91.
110. Altman J and Das GD, *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*. J Comp Neurol, 1965. 124(3): p. 319-35.
111. Kaplan MS and Hinds JW, *Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs*. Science, 1977. 197(4308): p. 1092-4.
112. Cayre M, Malaterre J, Scotto-Lomassese S, Strambi C, and Strambi A, *The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2002. 132(1): p. 1-15.
113. Lois C and Alvarez-Buylla A, *Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(5): p. 2074-7.
114. Kaplan MS and Bell DH, *Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus*. J Neurosci, 1984. 4(6): p. 1429-41.
115. Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, and Fuchs E, *Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(9): p. 5263-7.
116. Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, and Gross CG, *Neurogenesis in the neocortex of adult primates*. Science, 1999. 286(5439): p. 548-52.
117. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, and Gage FH, *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nat Med, 1998. 4(11): p. 1313-7.
118. Biebl M, Cooper CM, Winkler J, and Kuhn HG, *Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain*. Neurosci Lett, 2000. 291(1): p. 17-20.
119. Lois C, Garcia-Verdugo JM, and Alvarez-Buylla A, *Chain migration of neuronal precursors*. Science, 1996. 271(5251): p. 978-81.
120. Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, and Lledo PM, *Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb*. Nat Neurosci, 2003. 6(5): p. 507-18.
121. Corotto FS, Henegar JR, and Maruniak JA, *Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse*. Neuroscience, 1994. 61(4): p. 739-44.

122. Cummings DM, Henning HE, and Brunjes PC, *Olfactory bulb recovery after early sensory deprivation*. J Neurosci, 1997. 17(19): p. 7433-40.
123. Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, and Weiss S, *Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin*. Science, 2003. 299(5603): p. 117-20.
124. Seki T and Arai Y, *Temporal and spacial relationships between PSA-NCAM-expressing, newly generated granule cells, and radial glia-like cells in the adult dentate gyrus*. J Comp Neurol, 1999. 410(3): p. 503-13.
125. Markakis EA and Gage FH, *Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles*. J Comp Neurol, 1999. 406(4): p. 449-60.
126. van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, and Gage FH, *Functional neurogenesis in the adult hippocampus*. Nature, 2002. 415(6875): p. 1030-4.
127. Gould E, Tanapat P, Hastings NB, and Shors TJ, *Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning*. Trends Cogn Sci, 1999. 3(5): p. 186-192.
128. Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, and Wojtowicz JM, *A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory*. Neuroscience, 2005. 130(4): p. 843-52.
129. Raber J, Rola R, LeFevour A, Morhardt D, Curley J, Mizumatsu S, VandenBerg SR, and Fike JR, *Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis*. Radiat Res, 2004. 162(1): p. 39-47.
130. Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, and Gould E, *Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories*. Nature, 2001. 410(6826): p. 372-6.
131. Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, and Gould E, *Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning*. Hippocampus, 2002. 12(5): p. 578-84.
132. Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, and Vannier MW, *Hippocampal atrophy in recurrent major depression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(9): p. 3908-13.
133. Scott BW, Wojtowicz JM, and Burnham WM, *Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures*. Exp Neurol, 2000. 165(2): p. 231-6.
134. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, and Duman RS, *Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus*. J Neurosci, 2000. 20(24): p. 9104-10.
135. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, and Shors TJ, *Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation*. Nat Neurosci, 1999. 2(3): p. 260-5.
136. Kempermann G, Kuhn HG, and Gage FH, *More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment*. Nature, 1997. 386(6624): p. 493-5.
137. van Praag H, Kempermann G, and Gage FH, *Neural consequences of environmental enrichment*. Nat Rev Neurosci, 2000. 1(3): p. 191-8.
138. van Praag H, Kempermann G, and Gage FH, *Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus*. Nat Neurosci, 1999. 2(3): p. 266-70.
139. Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, and Gould E, *Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat*. J Neurosci, 1999. 19(14): p. 5792-801.
140. Gould E and Tanapat P, *Stress and hippocampal neurogenesis*. Biol Psychiatry, 1999. 46(11): p. 1472-9.
141. Parent JM, Valentin VV, and Lowenstein DH, *Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway*. J Neurosci, 2002. 22(8): p. 3174-88.
142. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, and Lowenstein DH, *Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus*. J Neurosci, 1997. 17(10): p. 3727-38.

143. Kokaia Z and Lindvall O, *Neurogenesis after ischaemic brain insults*. Curr Opin Neurobiol, 2003. 13(1): p. 127-32.
144. Sharp FR, Liu J, and Bernabeu R, *Neurogenesis following brain ischemia*. Brain Res Dev Brain Res, 2002. 134(1-2): p. 23-30.
145. Hellsten J, Wennstrom M, Mohapel P, Ekdahl CT, Bengzon J, and Tingstrom A, *Electroconvulsive seizures increase hippocampal neurogenesis after chronic corticosterone treatment*. Eur J Neurosci, 2002. 16(2): p. 283-90.
146. Yanamoto H, Miyamoto S, Tohnai N, Nagata I, Xue JH, Nakano Y, Nakajo Y, and Kikuchi H, *Induced spreading depression activates persistent neurogenesis in the subventricular zone, generating cells with markers for divided and early committed neurons in the caudate putamen and cortex*. Stroke, 2005. 36(7): p. 1544-50.
147. Zilles K, *The Cortex of the Rat. A Stereotaxic Atlas*. Springer Verlag, Berlin, 1985.
148. Sturn A, Quackenbush J, and Trajanoski Z, *Genesis: cluster analysis of microarray data*. Bioinformatics, 2002. 18(1): p. 207-8.
149. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, and Speleman F, *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. 3(7): p. research0034.1-11.
150. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, and Ginsberg MD, *Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis*. Ann Neurol, 1985. 17(5): p. 497-504.
151. Schiene K, Bruehl C, Zilles K, Qu M, Hagemann G, Kraemer M, and Witte OW, *Neuronal hyperexcitability and reduction of GABAA-receptor expression in the surround of cerebral photothrombosis*. J Cereb Blood Flow Metab, 1996. 16(5): p. 906-14.
152. Dietrich WD, Watson BD, Busto R, Ginsberg MD, and Bethea JR, *Photochemically induced cerebral infarction. I. Early microvascular alterations*. Acta Neuropathol (Berl), 1987. 72(4): p. 315-25.
153. Morris R, *Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat*. J Neurosci Methods, 1984. 11(1): p. 47-60.
154. Morris RGM, *Spatial localization does not require the presence of local cues*. Learning Motiv, 1981. 12: p. 239-260.
155. Choi SH, Woodlee MT, Hong JJ, and Schallert T, *A simple modification of the water maze test to enhance daily detection of spatial memory in rats and mice*. J Neurosci Methods, 2006.
156. Reid RA and Reid AK, *Route finding by rats in an open arena*. Behav Processes, 2005. 68(1): p. 51-67.
157. Lipp HP and Wolfer DP, *Genetically modified mice and cognition*. Curr Opin Neurobiol, 1998. 8(2): p. 272-80.
158. Whishaw IQ, Cassel JC, and Jarrad LE, *Rats with fimbria-fornix lesions display a place response in a swimming pool: a dissociation between getting there and knowing where*. J Neurosci, 1995. 15(8): p. 5779-88.
159. Miettinen S, Fusco FR, Yrjanheikki J, Keinanen R, Hirvonen T, Roivainen R, Narhi M, Hokfelt T, and Koistinaho J, *Spreading depression and focal brain ischemia induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through N-methyl-D-aspartic acid-receptors and phospholipase A2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(12): p. 6500-5.
160. Aoki K, Uchihara T, Tsuchiya K, Nakamura A, Ikeda K, and Wakayama Y, *Enhanced expression of aquaporin 4 in human brain with infarction*. Acta Neuropathol (Berl), 2003. 106(2): p. 121-4.
161. Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E, Tamatani M, Kobayashi A, Yokawa T, Maruno M, Kato A, Ohnishi T, Kohmura E, Tohyama M, and Yoshimine T, *Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat*. Brain Res Mol Brain Res, 2000. 78(1-2): p. 131-7.

162. Tang Y, Lu A, Aronow BJ, Wagner KR, and Sharp FR, *Genomic responses of the brain to ischemic stroke, intracerebral haemorrhage, kainate seizures, hypoglycemia, and hypoxia*. Eur J Neurosci, 2002. 15(12): p. 1937-52.
163. Lu A, Tang Y, Ran R, Clark JF, Aronow BJ, and Sharp FR, *Genomics of the periinfarction cortex after focal cerebral ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. 23(7): p. 786-810.
164. Yokota N, Uchijima M, Nishizawa S, Namba H, and Koide Y, *Identification of differentially expressed genes in rat hippocampus after transient global cerebral ischemia using subtractive cDNA cloning based on polymerase chain reaction*. Stroke, 2001. 32(1): p. 168-74.
165. von Gertten C, Holmin S, Mathiesen T, and Nordqvist AC, *Increases in matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA after cerebral contusion and depolarisation*. J Neurosci Res, 2003. 73(6): p. 803-10.
166. Wang X, Barone FC, White RF, and Feuerstein GZ, *Subtractive cloning identifies tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) increased gene expression following focal stroke*. Stroke, 1998. 29(2): p. 516-20.
167. Kokaia Z, Andsberg G, Yan Q, and Lindvall O, *Rapid alterations of BDNF protein levels in the rat brain after focal ischemia: evidence for increased synthesis and anterograde axonal transport*. Exp Neurol, 1998. 154(2): p. 289-301.
168. Sasaki T, Iwata S, Okano HJ, Urasaki Y, Hamada J, Tanaka H, Dang NH, Okano H, and Morimoto C, *Nedd9 protein, a Cas-L homologue, is upregulated after transient global ischemia in rats: possible involvement of Nedd9 in the differentiation of neurons after ischemia*. Stroke, 2005. 36(11): p. 2457-62.
169. Lockhart DJ and Barlow C, *Expressing what's on your mind: DNA arrays and the brain*. Nat Rev Neurosci, 2001. 2(1): p. 63-8.
170. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, and Gerstein M, *Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale*. Genome Biol, 2003. 4(9): p. 117.
171. Paxinos G and Watson C, *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed. 1998, San Diego: Academic Press. 1 v. (unpaged).
172. Marrannes R, Willems R, De Prins E, and Wauquier A, *Evidence for a role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat*. Brain Res, 1988. 457(2): p. 226-40.
173. Bonthius DJ and Steward O, *Induction of cortical spreading depression with potassium chloride upregulates levels of messenger RNA for glial fibrillary acidic protein in cortex and hippocampus: inhibition by MK-801*. Brain Res, 1993. 618(1): p. 83-94.
174. Jander S, Schroeter M, Peters O, Witte OW, and Stoll G, *Cortical spreading depression induces proinflammatory cytokine gene expression in the rat brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 2001. 21(3): p. 218-25.
175. Wiggins AK, Shen PJ, and Gundlach AL, *Delayed, but prolonged increases in astrocytic clusterin (ApoJ) mRNA expression following acute cortical spreading depression in the rat: evidence for a role of clusterin in ischemic tolerance*. Brain Res Mol Brain Res, 2003. 114(1): p. 20-30.
176. Gursoy-Ozdemir Y, Qiu J, Matsuoka N, Bolay H, Bempohl D, Jin H, Wang X, Rosenberg GA, Lo EH, and Moskowitz MA, *Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9*. J Clin Invest, 2004. 113(10): p. 1447-55.
177. Thompson CS and Hakim AM, *Cortical spreading depression modifies components of the inflammatory cascade*. Mol Neurobiol, 2005. 32(1): p. 51-8.
178. Gygi SP, Rochon Y, Franz A, and Aebersold R, *Correlation between protein and mRNA abundance in yeast*. Mol Cell Biol, 1999. 19(3): p. 1720-30.
179. Futcher B, Latter GI, Monardo P, McLaughlin CS, and Garrels JI, *A sampling of the yeast proteome*. Mol Cell Biol, 1999. 19(11): p. 7357-68.

180. Greenbaum D, Jansen R, and Gerstein M, *Analysis of mRNA expression and protein abundance data: an approach for the comparison of the enrichment of features in the cellular population of proteins and transcripts*. Bioinformatics, 2002. 18(4): p. 585-96.
181. Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, Cantor A, Coppola D, and Yeatman TJ, *Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling*. J Natl Cancer Inst, 2002. 94(7): p. 513-21.
182. Altar CA, Laeng P, Jurata LW, Brockman JA, Lemire A, Bullard J, Bukhman YV, Young TA, Charles V, and Palfreyman MG, *Electroconvulsive seizures regulate gene expression of distinct neurotrophic signaling pathways*. J Neurosci, 2004. 24(11): p. 2667-77.
183. O'Donovan KJ, Tourtellotte WG, Millbrandt J, and Baraban JM, *The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience*. Trends Neurosci, 1999. 22(4): p. 167-73.
184. Cao XM, Koski RA, Gashler A, McKiernan M, Morris CF, Gaffney R, Hay RV, and Sukhatme VP, *Identification and characterization of the Egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals*. Mol Cell Biol, 1990. 10(5): p. 1931-9.
185. Rylski M and Kaczmarek L, *Ap-1 targets in the brain*. Front Biosci, 2004. 9: p. 8-23.
186. Leaner VD, Kinoshita I, and Birrer MJ, *AP-1 complexes containing cJun and JunB cause cellular transformation of Rat1a fibroblasts and share transcriptional targets*. Oncogene, 2003. 22(36): p. 5619-29.
187. Lee MC, Rho JL, Kim MK, Woo YJ, Kim JH, Nam SC, Suh JJ, Chung WK, Moon JD, and Kim HI, *c-JUN expression and apoptotic cell death in kainate-induced temporal lobe epilepsy*. J Korean Med Sci, 2001. 16(5): p. 649-56.
188. Domanska-Janik K, Bong P, Bronisz-Kowalczyk A, Zajac H, and Zablocka B, *AP1 transcriptional factor activation and its relation to apoptosis of hippocampal CA1 pyramidal neurons after transient ischemia in gerbils*. J Neurosci Res, 1999. 57(6): p. 840-6.
189. Herdegen T and Waetzig V, *AP-1 proteins in the adult brain: facts and fiction about effectors of neuroprotection and neurodegeneration*. Oncogene, 2001. 20(19): p. 2424-37.
190. Theodosiou A and Ashworth A, *MAP kinase phosphatases*. Genome Biol, 2002. 3(7): p. REVIEWS3009.
191. Rawlings JS, Rosler KM, and Harrison DA, *The JAK/STAT signaling pathway*. J Cell Sci, 2004. 117(Pt 8): p. 1281-3.
192. el-Ghissassi F, Valsesia-Wittmann S, Falette N, Duriez C, Walden PD, and Puisieux A, *BTG2(TIS21/PC3) induces neuronal differentiation and prevents apoptosis of terminally differentiated PC12 cells*. Oncogene, 2002. 21(44): p. 6772-78.
193. Iacopetti P, Barsacchi G, Tirone F, Maffei L, and Cremisi F, *Developmental expression of PC3 gene is correlated with neuronal cell birthday*. Mech Dev, 1994. 47(2): p. 127-37.
194. Bradbury A, Possenti R, Shooter EM, and Tirone F, *Molecular cloning of PC3, a putatively secreted protein whose mRNA is induced by nerve growth factor and depolarization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(8): p. 3353-7.
195. Trendelenburg G, Prass K, Priller J, Kapinya K, Polley A, Muselmann C, Ruscher K, Kannbley U, Schmitt AO, Castell S, Wiegand F, Meisel A, Rosenthal A, and Dirnagl U, *Serial analysis of gene expression identifies metallothionein-II as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia*. J Neurosci, 2002. 22(14): p. 5879-88.
196. Mitchell K, Kariko K, Harris VA, Rangel Y, Keller JM, and Welsh FA, *Preconditioning with cortical spreading depression does not upregulate Cu/Zn-SOD or Mn-SOD in the cerebral cortex of rats*. Brain Res Mol Brain Res, 2001. 96(1-2): p. 50-8.
197. Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, and Goldman SA, *Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain*. J Neurosci, 2001. 21(17): p. 6718-31.

198. Lee J, Duan W, and Mattson MP, *Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice*. J Neurochem, 2002. 82(6): p. 1367-75.
199. Ghosh A, Carnahan J, and Greenberg ME, *Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons*. Science, 1994. 263(5153): p. 1618-23.
200. Beck T, Lindholm D, Castren E, and Wree A, *Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus*. J Cereb Blood Flow Metab, 1994. 14(4): p. 689-92.
201. Schabitz WR, Berger C, Kollmar R, Seitz M, Tanay E, Kiessling M, Schwab S, and Sommer C, *Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia*. Stroke, 2004. 35(4): p. 992-7.
202. Rose CR, Blum R, Kafitz KW, Kovalchuk Y, and Konnerth A, *From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels*. Bioessays, 2004. 26(11): p. 1185-94.
203. Ango F, Pin JP, Tu JC, Xiao B, Worley PF, Bockaert J, and Fagni L, *Dendritic and axonal targeting of type 5 metabotropic glutamate receptor is regulated by homer1 proteins and neuronal excitation*. J Neurosci, 2000. 20(23): p. 8710-6.
204. Mikoshiba K, Fukuda M, Iyata K, Kabayama H, and Mizutani A, *Role of synaptotagmin, a Ca²⁺ and inositol polyphosphate binding protein, in neurotransmitter release and neurite outgrowth*. Chem Phys Lipids, 1999. 98(1-2): p. 59-67.
205. Bennett MK, Garcia-Araras JE, Elferink LA, Peterson K, Fleming AM, Hazuka CD, and Scheller RH, *The syntaxin family of vesicular transport receptors*. Cell, 1993. 74(5): p. 863-73.
206. Rizo J and Sudhof TC, *Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion*. Nat Rev Neurosci, 2002. 3(8): p. 641-53.
207. Dumont I, Hou X, Hardy P, Peri KG, Beauchamp M, Najarian T, Molotchnikoff S, Varma DR, and Chemtob S, *Developmental regulation of endothelial nitric oxide synthase in cerebral vessels of newborn pig by prostaglandin E(2)*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. 291(2): p. 627-33.
208. Benaud C, Gentil BJ, Assard N, Court M, Garin J, Delphin C, and Baudier J, *AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture*. J Cell Biol, 2004. 164(1): p. 133-44.
209. van de Graaf SF, Hoenderop JG, Gkika D, Lamers D, Prenen J, Rescher U, Gerke V, Staub O, Nilius B, and Bindels RJ, *Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex*. Embo J, 2003. 22(7): p. 1478-87.
210. Vallenius T, Scharm B, Vesikansa A, Luukko K, Schafer R, and Makela TP, *The PDZ-LIM protein RIL modulates actin stress fiber turnover and enhances the association of alpha-actinin with F-actin*. Exp Cell Res, 2004. 293(1): p. 117-28.
211. Wang J and Tsirka SE, *Neuroprotection by inhibition of matrix metalloproteinases in a mouse model of intracerebral haemorrhage*. Brain, 2005.
212. Schreiber G, Southwell BR, and Richardson SJ, *Hormone delivery systems to the brain-transthyretin*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1995. 103(2): p. 75-80.
213. Smith D, Wagner E, Koul O, McCaffery P, and Drager UC, *Retinoic acid synthesis for the developing telencephalon*. Cereb Cortex, 2001. 11(10): p. 894-905.
214. Balmer JE and Blomhoff R, *Gene expression regulation by retinoic acid*. J Lipid Res, 2002. 43(11): p. 1773-808.
215. Rodriguez-Pena A, *Oligodendrocyte development and thyroid hormone*. J Neurobiol, 1999. 40(4): p. 497-512.
216. Gajovic S, St-Onge L, Yokota Y, and Gruss P, *Retinoic acid mediates Pax6 expression during in vitro differentiation of embryonic stem cells*. Differentiation, 1997. 62(4): p. 187-92.

217. Palha JA, Fernandes R, de Escobar GM, Episkopou V, Gottesman M, and Saraiva MJ, *Transthyretin regulates thyroid hormone levels in the choroid plexus, but not in the brain parenchyma: study in a transthyretin-null mouse model*. Endocrinology, 2000. 141(9): p. 3267-72.
218. Palha JA, Hays MT, Morreale de Escobar G, Episkopou V, Gottesman ME, and Saraiva MJ, *Transthyretin is not essential for thyroxine to reach the brain and other tissues in transthyretin-null mice*. Am J Physiol, 1997. 272(3 Pt 1): p. E485-93.
219. Liverman CS, Cui L, Yong C, Choudhuri R, Klein RM, Welch KM, and Berman NE, *Response of the brain to oligemia: gene expression, c-Fos, and Nrf2 localization*. Brain Res Mol Brain Res, 2004. 126(1): p. 57-66.
220. Benvenga S, Morgante L, Bartalena L, Manna L, Li Calzi L, Coraci MA, and Trimarchi F, *Serum thyroid hormones and thyroid hormone binding proteins in patients with completed stroke*. Ann Clin Res, 1986. 18(4): p. 203-7.
221. Muramatsu H, Kariko K, and Welsh FA, *Induction of tolerance to focal ischemia in rat brain: dissociation between cortical lesioning and spreading depression*. J Cereb Blood Flow Metab, 2004. 24(10): p. 1167-71.
222. Horiguchi T, Snipes JA, Kis B, Shimizu K, and Busija DW, *The role of nitric oxide in the development of cortical spreading depression-induced tolerance to transient focal cerebral ischemia in rats*. Brain Res, 2005. 1039(1-2): p. 84-9.
223. Bidmon HJ, Emde B, Oermann E, Kubitz R, Witte OW, and Zilles K, *Heme oxygenase-1 (HSP-32) and heme oxygenase-2 induction in neurons and glial cells of cerebral regions and its relation to iron accumulation after focal cortical photothrombosis*. Exp Neurol, 2001. 168(1): p. 1-22.
224. Bidmon HJ, Kato K, Schleicher A, Witte OW, and Zilles K, *Transient increase of manganese-superoxide dismutase in remote brain areas after focal photothrombotic cortical lesion*. Stroke, 1998. 29(1): p. 203-10; discussion 211.
225. Wiggins AK, Shen PJ, and Gundlach AL, *Neuronal-NOS adaptor protein expression after spreading depression: implications for NO production and ischemic tolerance*. J Neurochem, 2003. 87(6): p. 1368-80.
226. Schroeter M, Kury P, and Jander S, *Inflammatory gene expression in focal cortical brain ischemia: differences between rats and mice*. Brain Res Mol Brain Res, 2003. 117(1): p. 1-7.
227. Bidmon HJ, Oermann E, Schiene K, Schmitt M, Kato K, Asayama K, Witte OW, and Zilles K, *Unilateral upregulation of cyclooxygenase-2 following cerebral, cortical photothrombosis in the rat: suppression by MK-801 and co-distribution with enzymes involved in the oxidative stress cascade*. J Chem Neuroanat, 2000. 20(2): p. 163-76.
228. Redecker C, Wang W, Fritschy JM, and Witte OW, *Widespread and long-lasting alterations in GABA(A)-receptor subtypes after focal cortical infarcts in rats: mediation by NMDA-dependent processes*. J Cereb Blood Flow Metab, 2002. 22(12): p. 1463-75.
229. Que M, Schiene K, Witte OW, and Zilles K, *Widespread up-regulation of N-methyl-D-aspartate receptors after focal photothrombotic lesion in rat brain*. Neurosci Lett, 1999. 273(2): p. 77-80.
230. Keyvani K, Bosse F, Reinecke S, Paulus W, and Witte OW, *Postlesional transcriptional regulation of metabotropic glutamate receptors: implications for plasticity and excitotoxicity*. Acta Neuropathol (Berl), 2001. 101(2): p. 79-84.
231. Abrous DN, Koehl M, and Le Moal M, *Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology*. Physiol Rev, 2005. 85(2): p. 523-69.
232. Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, and Gage FH, *Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS*. J Neurosci, 1999. 19(19): p. 8487-97.
233. Lie DC, Dzieczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, and Gage FH, *The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential*. J Neurosci, 2002. 22(15): p. 6639-49.
234. Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, and Gage FH, *Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus*. J Neurosci, 2000. 20(23): p. 8727-35.

235. Alvarez-Buylla A and Lim DA, *For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain*. Neuron, 2004. 41(5): p. 683-6.
236. Seki T, *Microenvironmental elements supporting adult hippocampal neurogenesis*. Anat Sci Int, 2003. 78(2): p. 69-78.
237. Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, and Fuchs E, *Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation*. J Neurosci, 1997. 17(7): p. 2492-8.
238. Deisseroth K, Singla S, Toda H, Monje M, Palmer TD, and Malenka RC, *Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells*. Neuron, 2004. 42(4): p. 535-52.
239. Yanamoto H, *Cortical spreading depression can evoke extensive neurogenesis in adult rat brain*. 2003.
240. Arvidsson A, Kokaia Z, and Lindvall O, *N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke*. Eur J Neurosci, 2001. 14(1): p. 10-8.
241. Cameron HA, McEwen BS, and Gould E, *Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus*. J Neurosci, 1995. 15(6): p. 4687-92.
242. Nacher J, Alonso-Llosa G, Rosell DR, and McEwen BS, *NMDA receptor antagonist treatment increases the production of new neurons in the aged rat hippocampus*. Neurobiol Aging, 2003. 24(2): p. 273-84.
243. Nacher J, Rosell DR, Alonso-Llosa G, and McEwen BS, *NMDA receptor antagonist treatment induces a long-lasting increase in the number of proliferating cells, PSA-NCAM-immunoreactive granule neurons and radial glia in the adult rat dentate gyrus*. Eur J Neurosci, 2001. 13(3): p. 512-20.
244. Bernabeu R and Sharp FR, *NMDA and AMPA/kainate glutamate receptors modulate dentate neurogenesis and CA3 synapsin-I in normal and ischemic hippocampus*. J Cereb Blood Flow Metab, 2000. 20(12): p. 1669-80.
245. Kitamura T, Mishina M, and Sugiyama H, *Enhancement of neurogenesis by running wheel exercises is suppressed in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit*. Neurosci Res, 2003. 47(1): p. 55-63.
246. Tovar KR and Westbrook GL, *The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro*. J Neurosci, 1999. 19(10): p. 4180-8.
247. Pandis C, Sotiriou E, Kouvaras E, Asprodini E, Papatheodoropoulos C, and Angelatou F, *Differential expression of NMDA and AMPA receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus*. Neuroscience, 2006.
248. Wernsmann B, Pape HC, Speckmann EJ, and Gorji A, *Effect of cortical spreading depression on synaptic transmission of rat hippocampal tissues*. Eur J Neurosci, 2006. 23(5): p. 1103-10.
249. Springer JE, Gwag BJ, and Sessler FM, *Neurotrophic factor mRNA expression in dentate gyrus is increased following in vivo stimulation of the angular bundle*. Brain Res Mol Brain Res, 1994. 23(1-2): p. 135-43.
250. Kawahara N, Croll SD, Wiegand SJ, and Klatzo I, *Cortical spreading depression induces long-term alterations of BDNF levels in cortex and hippocampus distinct from lesion effects: implications for ischemic tolerance*. Neurosci Res, 1997. 29(1): p. 37-47.
251. Hallbergson A, Peterson LD, and Peterson DA. *BDNF gene delivery recruits endogenous entorhinal cortical progenitor cells and increases neurogenesis in downstream hippocampal dentate gyrus*
252. Wimer RE, Wimer CC, and Alameddine L, *On the development of strain and sex differences in granule cell number in the area dentata of house mice*. Brain Res, 1988. 470(2): p. 191-7.
253. Bayer SA, Yackel JW, and Puri PS, *Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life*. Science, 1982. 216(4548): p. 890-2.
254. Silva R, Lu J, Wu Y, Martins L, Almeida OF, and Sousa N, *Mapping cellular gains and losses in the postnatal dentate gyrus: Implications for psychiatric disorders*. Exp Neurol, 2006.

255. Kluska MM, Witte OW, Bolz J, and Redecker C, *Neurogenesis in the adult dentate gyrus after cortical infarcts: effects of infarct location, N-methyl-D-aspartate receptor blockade and anti-inflammatory treatment*. Neuroscience, 2005. 135(3): p. 723-35.
256. Chen Q, Chopp M, Bodzin G, and Chen H, *Temperature modulation of cerebral depolarization during focal cerebral ischemia in rats: correlation with ischemic injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 1993. 13(3): p. 389-94.
257. Takaoka S, Pearlstein RD, and Warner DS, *Hypothermia reduces the propensity of cortical tissue to propagate direct current depolarizations in the rat*. Neurosci Lett, 1996. 218(1): p. 25-8.
258. Kitahara Y, Taga K, Abe H, and Shimoji K, *The effects of anesthetics on cortical spreading depression elicitation and c-fos expression in rats*. J Neurosurg Anesthesiol, 2001. 13(1): p. 26-32.
259. Cooper-Kuhn CM and Kuhn HG, *Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain*. Brain Res Dev Brain Res, 2002. 134(1-2): p. 13-21.
260. Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, and Wojtowicz JM, *The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis*. J Neurosci Methods, 2002. 115(1): p. 97-105.
261. Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, and Eriksson PS, *Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory*. J Neurobiol, 1999. 39(4): p. 569-78.
262. Roy V, Belzung C, Delarue C, and Chapillon P, *Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor*. Physiol Behav, 2001. 74(3): p. 313-20.
263. Rola R, Raber J, Rizk A, Otsuka S, VandenBerg SR, Morhardt DR, and Fike JR, *Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice*. Exp Neurol, 2004. 188(2): p. 316-30.
264. Kleindienst A, McGinn MJ, Harvey HB, Colello RJ, Hamm RJ, and Bullock MR, *Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury*. J Neurotrauma, 2005. 22(6): p. 645-55.
265. Meshi D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D, Santarelli L, Malapani C, Moore H, and Hen R, *Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment*. Nat Neurosci, 2006.

DATEN DER MICROARRAY-EXPRESSIONSANALYSE

Tabelle A Transkripte, die 3 h nach Spreading depression (SD) mindestens 2-fach differentiell exprimiert waren. Schattiert = ähnliche Expression nach SD bereits aus Literatur bekannt; Fett = Änderung entspricht der im ipsilateralen *remote* Kortex nach fokaler Ischämie; x = Regulation bekannt aus Literatur zu Änderungen in post-ischämischem Gewebe. Für Gene, die aus früheren Studien im Zusammenhang mit SD oder Ischämie bekannt waren, sind die entsprechenden Referenzen angegeben.

Gen	Public ID	Gensymbol	3h	Fold change				Referenzen
				24h	7d	30d		
Hochregulierte mRNAs								
x	fos-like antigen 2	NM_012954	FOSL2 / FRA2	48.5	-	-	-	[1, 3]
	Transcribed locus	BF522317	---	36.8	-	-	-	
x	chemokine ligand 2 / monocyte chemoattractant protein-1	NM_031530	CCL2 / MCP-1	32.0	6.5	-	-	[1, 4, 6]
	carbonyl reductase 3 (predicted)	BI282197	Cbr3	32.0	-	-	-	
x	c-fos oncogene	BF415939	c-Fos	19.7	-	-2.0	1.6	[1, 4, 7-9]
	early growth response 4	NM_019137	EGR4 / NGFI-C	19.7	-	-	-	[10]
x	activating transcription factor 3	NM_012912	ATF3	16.0	-	-	-	[11]
	early growth response 2	D83508	EGR2 / KROX20	16.0	-	-	1.3	[10]
	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	U03389	PTGS2 / Cox2	14.9	1.6	1.7	-	[12-14]
x	brain derived neurotrophic factor	X67108	BDNF	14.9	-	-	-	[4, 7, 29, 30]
	homer homolog 1 (Drosophila), neuronal immediate early gene, 1	AF030088	Homer1	14.9	-2.1	-	-	
x	MAP-kinase phosphatases / dual specificity phosphatase 5	NM_133578	CPG21 / Dusp5	13.0	-	-	-	[1, 19]
	---	AI228623	---	10.6	1.6	-	-	
	Jun-B oncogene	NM_021836	JunB	10.6	2.1	-	-	[9, 15]
	nucleoporin 98	NM_031074	NUP98	9.8	-	-	-	
x	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma (predicted)	AI599423	Gadd45 γ	9.8	-	-	-	[4]
x	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	NM_053819	TIMP1	9.2	4.3	8.0	-	[4, 26, 27]
	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	NM_031628	NR4A3	9.2	-1.6	-	-	
x	cAMP responsive element modulator	NM_017334	CREM	8.6	-	-	-	[4]
x	activity regulated cytoskeletal-associated protein	NM_019361	ARC	8.6	-1.6	-	1.9	[3]
	procollagen, type IX, alpha 1 (predicted)	BM388861	Col9a1	8.0	-	-	-	
	dual specificity phosphatase 1 / protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 16	BE110108	Dusp1 / PTPN16	7.5	-	-	-	
x	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 / immediate early gene transcription factor NGFI-B	NM_024388	NR4A1 / NGFI-B	7.5	-1.4	-1.6	1.7	[1, 3, 10]
	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	BI288701	BTG2 / PC3	7.5	-	-	-	[3]
	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	AI013390	CITED2	6.5	-	-	-	
	MAS1 oncogene	NM_012757	MAS1	6.1	-	-	-	
	Similar to 106 kDa O-GlcNAc transferase-interacting protein (predicted)	AI175534	---	6.1	-	-	-	
	Transcribed locus	AI178746	---	6.1	-	-	-	
	Thrombospondin 2 (predicted)	AI406660	TSP-2	5.7	-	-	-	
	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	U72345	NR4A2 / Nurr1	5.3	-	-	-	[10]
x	interferon-related developmental regulator 1	NM_019242	IFRD1 / PC4	4.9	-	-	-	[19]
	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta (predicted)	BI287978	Gadd45 β	4.9	-	-	-	
	early growth response 2	D83508	EGR2 / KROX20	4.9	-	-	-	[10]
	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	AI013390	CITED2	4.6	1.4	-	-	
x	regulator of G-protein signaling protein 2	AY043246	RGS2 / G0S8	4.6	-	-	-	[4]
x	nuclear factor, interleukin 3-regulated	NM_053727	NFIL3	4.6	-	-	-	[4]
x	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	BI288619	c-Jun	4.6	1.9	-	-	[1, 3, 9, 15]
	Transcribed locus, weakly similar to NP_002639.1 proviral integration site 1	AI598401	---	4.6	-	-	-	
	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase (predicted)	AI179464	Tiparp	4.6	-	-	-	
	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2 (predicted)	BM388710	Dyrk2	4.6	-	-	-	
	dual specificity phosphatase 1 / protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 16	BE110108	PTPN16 / Dusp1	4.3	-	-1.3	-	
	tribbles homolog 1 (Drosophila)	BM387324	Trib1	4.3	1.4	-	-	
x	synaptotagmin 4	L38247	SYT4	4.3	2.5	-	-	[24]
	protocadherin 8	NM_022868	PCDH8	4.0	-	-	-	

x	metallothionein	AF411318	MT1A	4.0	-	-	-	[1, 4]
	Similar to hypothetical protein FLJ13448	AI228596	---	4.0	-	-	-	
	Transcribed locus, moderately similar to XP_546599.1 PREDICTED: similar to KIAA0346 [Canis familiaris]	BF396191	---	4.0	-	-	-	
	dual specificity phosphatase 6 / MAPK phosphatase 3	AI602811	Dusp6	4.0	-	-	-	
	intercellular adhesion molecule 1	NM_012967	ICAM1	4.0	-	-	-	
x	3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-Coenzyme A reductase	NM_013134	HMGCR	4.0	1.6	-	-	[4]
	myeloid differentiation primary response gene 116	BI284349	MYD116	3.7	1.3	-	-	
	unknown protein	BE118080	---	3.7	-	-	-	
	Similar to Ext1	BM384468	---	3.7	-	-	-	
	dual specificity phosphatase 6 / MAPK phosphatase 3	AI231350	DUSP6 / MKP3	3.7	-	-	-	
	dual specificity phosphatase 6 / MAPK phosphatase 3	NM_053883	DUSP6 / MKP3	3.7	-	-	-	
x	regulator of G-protein signaling protein 2	AY043246	RGS2	3.7	-	-	-	[4]
	tumor necrosis factor induced protein 6	AF159103	TNFIIP6	3.5	-	-	-	
	Phosphofructokinase, liver, B-type	AI408151	PfkI	3.5	-	-	-	
	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 5 (predicted)	BM386741	HSC40 / DNAJB5	3.5	-	-	-	
	Transcribed locus, weakly similar to XP_341951.1 PREDICTED: Protein tyrosine phosphatase, receptor type, epsilon polypeptide [Rattus norvegicus]	AI031032	---	3.5	-	-1.3	-	
	rad and gem related GTP binding protein 2	BI296482	REM2	3.5	-	-	-	
	Transcribed locus	AI409904	---	3.5	-	-	-	
	activity and neurotransmitter-induced early gene protein 4 (ania-4)	NM_021584	ANIA4	3.5	1.5	-	1.3	
	zinc finger protein 36	AB025017	ZFP36 / TTP	3.5	1.7	-	-	
x	immediate early response 3	AI176519	LER3	3.5	1.7	-	-	[4]
x	secretogranin 2	NM_022669	SgII / CgC	3.2	-	-	-	[3, 25]
x	early growth response 1 (NGFI-A)	NM_012551	EGR1 / KROX24	3.2	-1.3	-1.6	-	[1, 3, 10, 15]
	Transcribed locus	AI172302	---	3.2	-	-	-	
	sprouty homolog 2 (Drosophila) (predicted)	BM390457	Spry2	3.2	-	-	-	
	Transcribed locus	BE101108	---	3.2	-	-	-	
	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	BI288701	BTG2 / PC3	3.2	-	-	-	[3]
	tumor-associated protein 1	NM_017353	TA1 / Slc7a5	3.2	1.7	-	-	
	jumonji domain containing 3 (predicted)	BE118720	Jmjd3	3.2	-	-	-	
x	cysteine rich protein 61	NM_031327	CYR61	3.0	-	-	-	[4, 11]
x	VGF nerve growth factor inducible	NM_030997	VGF	3.0	1.6	-	-	[3]
	regulator of G-protein signaling 4	U27767	RGS4	3.0	-	-1.5	-	[3]
	SNF1-like kinase	AB020480	SNF1LK	3.0	-	-	-	
	RING finger protein LIRF	NM_134374	LIRF / Rnf39	3.0	-	1.3	-	
	vesicle-associated membrane protein 1	M24104	VAMP1	3.0	-	-	-	
	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	M55292	NTRK2 / TRKB	3.0	-	-	-2.0	[30]
	musculoskeletal, embryonic nuclear protein 1	AW251450	MUSTANG / Mustn1	3.0	1.5	-	-	
	Ras homolog gene family, member E	AI103572	Arhe	3.0	1.4	-	-	
	Transcribed locus	AI145359	---	3.0	-	-	-	
	Transcribed locus	BF389682	---	3.0	3.5	-	-	
	Transcribed locus	AW525765	---	3.0	-	-	1.3	
	Transcribed locus, strongly similar to NP_084275.3 limb-bud and heart [Mus musculus]	AA800701	---	3.0	-	-	-	
	Similar to Ab2-095 (predicted)	AI407536	---	3.0	-	-	-	
x	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	BI288619	c-Jun	3.0	1.7	-	-	[1, 3, 9, 15]
	Transcribed locus	AW531735	---	3.0	-	-	-	
	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	NM_053539	IDI1	2.8	-	-	-	
	four and a half LIM domains 2	NM_031677	FHL2	2.8	-	-	-	
	Jun dimerization protein 2	NM_053894	JUNDP2	2.8	-	-	-	
x	small inducible cytokine A4 / lymphocyte-activation gene 1	U06434	CCL4 / MIP-1 β	2.8	-	-	-	[4]
	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 25	AI177358	Slc25a25	2.8	-1.4	-	-	
x	Activity and neurotransmitter-induced early gene 2 (ania-2) mRNA, 3'UTR	AI013468	ANIA2	2.8	-	-	-	[1]
	potassium channel, subfamily V, member 1	BF391696	KCNV1	2.8	-1.5	-1.2	-	
	Transcribed locus	BF283381	---	2.8	1.7	-	-	
	cyclin L	NM_053662	CCNL	2.6	-	-	-	
	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene family, protein G	AB050011	MAFG	2.6	1.9	-	-	
x	chemokine ligand 3, macrophage inflammatory protein 1-α	U22414	CCL3 / MIP-1 α	2.6	-	-	-	[1, 3, 4]

	emerin	NM_012948	EMD	2.6	-	-	-	
	tropomyosin 1, alpha	AF372216	TPM1	2.6	1.7	-	-	
	calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit	AF389419	CACNA1B	2.6	1.6	-	-	
	similar to hypothetical protein MGC6835	BM390487	---	2.6	-	-	-	
	similar to mKIAA1107 protein (predicted)	BI300727	---	2.6	-1.5	-1.2	-	
	---	BE105699	---	2.6	-	-	-	
	Transcribed sequence with moderate similarity to protein sp:P00722 (E. coli) BGAL_ECOLI Beta-galactosidase	BE098803	---	2.6	-	-	-	
	Transcribed locus	AI111965	---	2.6	-	-	-	
	FERM-domain-containing protein 163SCII	AA892299	---	2.6	-1.4	-	-	
	Similar to pellino protein	AI712911	---	2.6	-	-	-	
	Kruppel-like factor 5	NM_053394	KLF5	2.5	-	-	-	
x	Janus kinase 2	NM_031514	JAK2	2.5	1.6	-	-	[1]
	adenylate cyclase activating polypeptide 1	NM_016989	ADCYAP1	2.5	-	-1.6	-	
	BMP/retinoic acid-inducible neural-specific protein	NM_080482	Dbccr1	2.5	1.3	-	-	
	corticotropin releasing hormone binding protein	NM_139183	CRHBP	2.5	1.4	-	-	
	voltage-dependent calcium channel gamma-3 subunit	AF361340	CACNG3	2.5	-	-	-	
	glutamate decarboxylase 1	M38350	GAD1	2.5	-	-	-	
	microtubule-associated protein 6	AJ002556	MAP6	2.5	-	-	-	
	cholecystokinin B receptor	X79208	CCKBR	2.5	-	-	-	
x	signal transducer and activator of transcription 3	BI285863	Stat3	2.5	2.5	-	-	[1, 3]
	Similar to KIAA1010 protein (LOC309362), mRNA	BI296334	---	2.5	-	-	-	
	similar to SETA binding protein 1; SB1 (predicted)	BM389664	---	2.5	-	-	-	
x	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9 (predicted)	BM392374	Nedd9	2.5	-	-	-	[31]
	period homolog 1 (Drosophila)	BI279017	PER1	2.5	-	-	-	
	Kinesin family member 1B	BE109334	Kif1b	2.5	-	-	-	
	tissue factor pathway inhibitor 2	AI179507	TFPI2	2.5	-	-	-	
	calcium/calmodulin-dependent protein kinase I gamma	AW251224	CAMK1G	2.5	-	-	-	
	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1 (predicted)	BM384926	HSPF1	2.5	-	-	-	
	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisiae)	AB052846	SC5D	2.5	1.3	-	-	
	similar to Antxr2 protein	AI013888	---	2.5	2.5	-	-	
x	Fc receptor, IgG, low affinity III	NM_053843	FcγR3	2.5	-	-	-	[4]
	serine threonine kinase pim3	NM_022602	PIM3	2.3	-	-	-	
	insulin induced gene 1	NM_022392	INSIG1	2.3	-	-	-	
	polo-like kinase 2 (Drosophila)	NM_031821	Plk2	2.3	-	-	-	
x	microtubule-associated protein 2	X74211	MAP2	2.3	1.7	-	-	[1]
	chondroitin sulfate proteoglycan 5	AF292102	CSPG5	2.3	1.6	1.9	-	
	tropomyosin 1, alpha	NM_019131	TPM1	2.3	-	-	-	
	diphtheria toxin receptor	NM_012945	DTR	2.3	-	-	-	
	cholecystokinin B receptor	M99418	CCKBR	2.3	-	-	-	
x	cAMP responsive element modulator	NM_017334	CREM	2.3	-	-	-	[4]
	syntaxin binding protein 1	U06069	STXBP1	2.3	1.4	-	-	
	tropomyosin 1, alpha	AF370889	TPM1	2.3	1.9	-	-	
	SERTA domain containing 1	AA945069	Sertad1	2.3	1.6	-	-	
	Suppressor of cytokine signaling 2	BM384088	Socs2	2.3	-	-	-	
	similar to Mitogen-inducible gene 6 protein homolog (Mig-6) (Gene 33 polypeptide) (predicted)	AI169756	---	2.3	-	-	-	
	Transcribed locus	AI599365	---	2.3	-	-	-	
x	3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-Coenzyme A reductase	BM390399	HMGCR	2.3	-	-	-	[4]
	Similar to RIKEN cDNA 2310057H16 (predicted)	BI274903	---	2.3	1.9	-	-	
	Transcribed locus	AI176941	---	2.3	-	-	-	
	stanniocalcin 1	BM386683	Stc1	2.3	-	-	-	
	ribosome associated membrane protein 4	AI103695	RAMP4	2.3	1.5	-	-	
	immediate early response 5	BF285187	IER5	2.3	-	-	-	
	similar to RIKEN cDNA 1810057C19	BM391248	---	2.3	1.4	-	-	
	Transcribed locus	AI639181	---	2.3	-	-	-	
	natriuretic peptide precursor type A	NM_012612	NPPA / ANP	2.1	-	-	-	[6, 28]
	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	BG380723	CAP1	2.1	1.5	-	-	
x	aquaporin 4	NM_012825	AQP4	2.1	-	-	-1.4	[16, 17]
	basic helix-loop-helix domain containing, class B2	NM_053328	BHLHB2	2.1	1.6	-	-	
	rad and gem related GTP binding protein 2	NM_022685	REM2	2.1	-	-	-	

adrenergic receptor, beta 1	NM_012701	ADRB1	2.1	-	-	-	
fibroblast growth factor 12	AW252096	FGF12	2.1	-	-	-	
protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta (predicted)	D10770	Prkacb	2.1	1.4	-	-	
epithelial membrane protein 1	BI275741	EMP1	2.1	3.2	-	-	
spermidine/spermine N1-acetyl transferase	AA893220	SAT	2.1	-	1.4	-	
---	AA800031	FHL2	2.1	-	-	-	
---	AI412018	---	2.1	-	-	-	
actin related protein 2/3 complex, subunit 4 (predicted)	AI411582	Arpc4	2.1	-1.5	-	-	
acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E (predicted)	AI008642	Anp32e	2.1	-	-	-	
PHD finger protein 13 (predicted)	AI102512	Phf13	2.1	-	-	-	
SERTA domain containing 2	BI295862	Sertad2	2.1	-	-	-	
Activity and neurotransmitter-induced early gene 11 (ania-11) mRNA, 3' UTR / Zinc finger protein RIN ZF	BI289112	ANIA-11 / Rinzf	2.1	-	-	-	
similar to RIKEN cDNA 1110056N09 (predicted)	AI233751	---	2.1	-	-	1.3	
dual specificity phosphatase 2 (predicted)	AI408580	Dusp2	2.1	-	-	-	
Transcribed locus	BI291457	---	2.1	-	-	-	
tropomyosin 1, alpha	AA875132	TPM1	2.1	-	-	-	
proprotein convertase subtilisin/kexin type 1	M83745	PCSK2	2.1	-	-	-	
syntaxin 1a (brain)	NM_053788	STX1A	2.1	-	-	-	
Transcribed locus	AI112988	---	2.1	-	-	-	
abhydrolase domain containing 2 (predicted)	AI013474	Abhd2	2.1	-	-	-	
B-cell translocation gene 1, anti-proliferative -cell translocation gene 1	NM_017258	BTG1	2.0	-	-	-	
prostaglandin E synthase	AF280967	PTGES	2.0	-	-	-	
x fos-like antigen 1	NM_012953	FOSL1 / FRA1	2.0	-	-	-	[1]
G protein-coupled receptor kinase 6	NM_031657	GPRK6	2.0	-	-	-1.6	
ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 3 polypeptide	NM_012506	ATP1a3	2.0	-	-	-	
protein phosphatase 2C, magnesium-dependent, catalytic subunit	NM_019372	PDP1	2.0	-	-	-	
gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1	Y10369	GABBR1	2.0	1.7	-	-	
DNA topoisomerase (DNA) I	NM_022615	TOP1	2.0	-	-	-	
ATPase, Na+/K+ transporting, beta 2 polypeptide	U45946	ATP1b2	2.0	-	-	-2.0	
septin 3	NM_019375	Sept3	2.0	-	-	-	
RASD family, member 2	BF404624	RASD2	2.0	-	-	-	
translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast)	D63411	Tomm20	2.0	1.4	-	-	
CaM-kinase II inhibitor alpha	AA858621	---	2.0	1.9	-1.3	-	
protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type 2, alpha	AW919085	PRKAR2A	2.0	-	-	-	
ATPase, Na+K+ transporting, alpha 1	M74494	ATP1a1	2.0	-	-1.5	-1.2	
nitric oxide synthase 3, endothelial cell	AJ011116	NOS3 / eNOS	2.0	2.5	-	-	
Transcribed locus	BI296577	---	2.0	-	-	-	
ubiquitin-activating enzyme E1-domain containing 1 (predicted)	AI408025	Ube1dc1	2.0	1.5	1.3	-	
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein K (avian)	BI284461	Maik	2.0	-	-	-	
Uridine phosphorylase 1 (predicted)	BI292558	---	2.0	2.1	-	-	
---	AI176579	---	2.0	-1.3	-	-	
dual specificity phosphatase 14 (predicted) /// similar to Dual specificity phosphatase 14	AI236997	Dusp14	2.0	-	-	-	
Similar to TBP-associated factor 172 (TAF-172) (TAF(II)170)	BG374179	---	2.0	-	-	-	
similar to mKIAA1002 protein (predicted)	BI291270	---	2.0	-	-	-1.5	
peroxisomal biogenesis factor 13 (predicted)	AI012951	Pex13	2.0	-	-	-	
similar to 6030410K14Rik protein	BF288461	---	2.0	-	-	-	
potassium voltage-gated channel, subfamily F, member 1	BI282169	KCNF1	2.0	-	-	-	
Transcribed locus	BG376458	---	2.0	-	-	-	
vestigial like 4 (Drosophila) (predicted)	BI289645	Vgll4	2.0	-	-	-	
numb gene homolog (Drosophila)	BI287975	NUMB	2.0	-1.3	-	-	
destrin (predicted)	AI170442	Dstn	2.0	1.5	-	-	
---	AI103155	---	2.0	-	-	-	
similar to hypothetical protein 9630025C22	AW528861	---	2.0	-	-	-	
zinc finger protein 189 (predicted)	AI407872	Zfp189	2.0	-	-	-	
transformed mouse 3T3 cell double minute 2 (predicted)	BI296301	Mdm2	2.0	2.0	-	-	
N-arginine dibasic convertase 1	NM_012993	NRD1	2.0	-	-	-	
interleukin 1 receptor accessory protein	NM_012968	IL1RAP	2.0	-	-	-	
methionine adenosyltransferase II, alpha	NM_134351	MAT2A	2.0	2.1	-	-	
interferon induced transmembrane protein 3	BI285494	IFITM3L	2.0	2.1	1.4	-	

Transcribed locus	BG381046	---	2.0	-	-	-
isopentenyl-diphosphate delta isomerase	BI290053	IDI1	2.0	-	-	-
Sprouty-related, EVH1 domain containing 2 (predicted)	AI409218	---	2.0	-	-	-
Transcribed locus	AA943808	---	2.0	-	-1.2	-
similar to RIKEN cDNA 1810008K03 (predicted)	AI170665	---	2.0	-	-	-
elongation factor RNA polymerase II 2 (predicted)	BI291626	EII2	2.0	-	-	-
Transcribed locus	BI289584	---	2.0	-	-	-
similar to hypothetical protein AL133206 (predicted)	BE097445	---	2.0	-	-	-
Branched chain aminotransferase 1, cytosolic	BF393120	Bcat1	2.0	-	-	-
<i>Herabregulierte mRNAs</i>						
general transcription factor IIH, polypeptide 3 (predicted)	BM385649	Gtf2h3	-13.9	-	-	-
Similar to cDNA sequence BC018601	AI013005	---	-8.6	-	-	-
G protein-coupled receptor 149	AY030276	Gpr149	-3.7	-	-	-
similar to hypothetical protein	BF403886	---	-3.7	-	-	-
Transcribed locus	AI010668	---	-3.5	-1.4	-	-
---	BF401709	---	-3.2	-1.7	-	-
Transcribed locus	AA963909	---	-3.0	-	-	-
---	BF409816	---	-2.8	-	-	-
Transcribed locus	AI639109	---	-2.6	-	-	-
Similar to hypothetical protein (predicted)	BM385377	---	-2.5	-	-	-
Transcribed locus	BG670778	---	-2.5	-	-	-
Transcribed locus	BI296683	---	-2.5	-	-	-
Transcribed locus	AA893807	---	-2.3	-1.3	-	-
similar to RIKEN cDNA 4933433P14 gene (predicted)	BI285251	---	-2.3	-	-	-
Transcribed locus	AI231787	---	-2.3	-	-	-
Transcribed locus	BE101126	---	-2.3	-	-	-
Bromodomain containing 4 (predicted)	BF287135	---	-2.1	-	-	-
hypothetical LOC287199 (predicted)	AI010173	---	-2.1	-	-	-
Transcribed locus, weakly similar to XP_488528.1 hypothetical protein XP_488528 [Mus musculus]	AI411577	---	-2.1	-	-	-
zinc finger protein 297B (predicted)	AI013512	Zfp297b	-2.1	-	-	-
Transcribed locus	AI101164	---	-2.1	-1.2	-	-
non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1 (predicted)	BM386507	Nck1	-2.1	-	-	-
Transcribed locus	AA996836	---	-2.1	-	-	-
---	BI296626	---	-2.1	-	-	-
Wiskott-Aldrich syndrome-like (human)	BG375480	Wasl	-2.1	-	-	-
Transcribed locus	AW533838	---	-2.1	-	-	-
similar to cysteine and tyrosine-rich protein 1	AA818900	---	-2.1	-	-	-
similar to WD repeat membrane protein (predicted)	AI412437	---	-2.1	-	-	-
---	BF398716	---	-2.1	-	-	-
carnitine O-octanoyltransferase	J02844	CROT	-2.0	-1.4	-	-
ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 2 (predicted)	BI295982	Asb2	-2.0	-	-	-
selenophosphate synthetase 2 (predicted)	AA799700	Sephs2	-2.0	-	-	-
Calpain 7 (predicted)	AI169441	---	-2.0	-1.4	-	-
serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)	AI012590	STK17B / DRAK2	-2.0	-	-	-
Similar to hypothetical protein MGC5391	AI412606	---	-2.0	-	-	-
similar to open reading frame 5 (predicted)	BI295567	---	-2.0	-	-1.3	-
Transcribed locus	AI411374	---	-2.0	-	-	-
Transcribed locus	BI303362	---	-2.0	-	-	-
Transcribed locus	BI295240	---	-2.0	-	-	-
---	BE097945	---	-2.0	-1.7	1.3	-
---	AA891161	---	-2.0	-1.4	-	-
solute carrier organic anion transporter family, member 1a4	U95011	SLC21A5	-2.0	-1.2	-	-
neurogenic differentiation 1	NM_019218	NeuroD1	-2.0	-	-	-
TBC1 domain family, member 14 (predicted)	AI412244	Tbc1d14	-2.0	-	-	-
Transcribed locus	BE109616	---	-2.0	-	-	1.5
Transcribed locus, moderately similar to NP_444348.1 G protein-coupled receptor, family C, group 5, member D [Mus musculus]	BM382847	---	-2.0	-1.3	-	-
biregional cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes (Cdon) binding protein (predicted)	BE110539	Boc	-2.0	-1.3	-	-
Transcribed locus	BE109900	---	-2.0	-	-	-
Similar to hypothetical protein FLJ10706	BM385951	---	-2.0	-	-	-
---	AI639178	---	-2.0	-	-	-

Transcribed locus	BE107465	---	-2.0	-	-	-
Similar to SR rich protein (predicted)	BI292166	---	-2.0	-1.6	-	-

- Kury, P., Schroeter, M., Jander, S., *Transcriptional response to circumscribed cortical brain ischemia: spatiotemporal patterns in ischemic vs. remote non-ischemic cortex*. Eur J Neurosci, 2004. 19(7): p. 1708-20.
- Lu, X.C., Williams, A.J., Yao, C., Berti, R., Hartings, J.A., Whipple, R., Vahey, M.T., Polavarapu, R.G., Woller, K.L., Tortella, F.C., Dave, J.R., *Microarray analysis of acute and delayed gene expression profile in rats after focal ischemic brain injury and reperfusion*. J Neurosci Res, 2004. 77(6): p. 843-57.
- Schmidt-Kastner, R., Zhang, B., Belayev, L., Khoutorova, L., Amin, R., Busto, R., Ginsberg, M.D., *DNA microarray analysis of cortical gene expression during early recirculation after focal brain ischemia in rat*. Brain Res Mol Brain Res, 2002. 108(1-2): p. 81-93.
- Choudhuri, R., Cui, L., Yong, C., Bowyer, S., Klein, R.M., Welch, K.M., Berman, N.E., *Cortical spreading depression and gene regulation: relevance to migraine*. Ann Neurol, 2002. 51(4): p. 499-506.
- Kariko, K., Harris, V.A., Rangel, Y., Duvall, M.E., Welsh, F.A., *Effect of cortical spreading depression on the levels of mRNA coding for putative neuroprotective proteins in rat brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 1998. 18(12): p. 1308-15.
- Herrera, D.G., Maysinger, D., Almazan, G., Funnel, R., Cuellar, A.C., *Analysis of c-Fos and glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression following topical application of potassium chloride (KCl) to the brain surface*. Brain Res, 1998. 784(1-2): p. 71-81.
- Gass, P., Spranger, M., Herdegen, T., Bravo, R., Kock, P., Hacke, W., Kiessling, M., *Induction of FOS and JUN proteins after focal ischemia in the rat: differential effect of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801*. Acta Neuropathol (Berl), 1992. 84(5): p. 545-53.
- Honkaniemi, J., States, B.A., Weinstein, P.R., Espinoza, J., Sharp, F.R., *Expression of zinc finger immediate early genes in rat brain after permanent middle cerebral artery occlusion*. J Cereb Blood Flow Metab, 1997. 17(6): p. 636-46.
- Schwarz, D.A., Barry, G., Mackay, K.B., Manu, F., Naeve, G.S., Vana, A.M., Verge, G., Conlon, P.J., Foster, A.C., Maki, R.A., *Identification of differentially expressed genes induced by transient ischemic stroke*. Brain Res Mol Brain Res, 2002. 101(1-2): p. 12-22.
- Koistinaho, J., Pasonen, S., Yrjanheikki, J., Chan, P.H., *Spreading depression-induced gene expression is regulated by plasma glucose*. Stroke, 1999. 30(1): p. 114-9.
- Miettinen, S., Fusco, F.R., Yrjanheikki, J., Keinanen, R., Hirvonen, T., Roivainen, R., Narhi, M., Hokfelt, T., Koistinaho, J., *Spreading depression and focal brain ischemia induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through N-methyl-D-aspartic acid-receptors and phospholipase A2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(12): p. 6500-5.
- Yokota, C., Inoue, H., Kuge, Y., Abumiya, T., Tagaya, M., Hasegawa, Y., Ejima, N., Tamaki, N., Minematsu, K., *Cyclooxygenase-2 expression associated with spreading depression in a primate model*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. 23(4): p. 395-8.
- Kokaia, Z., Gido, G., Ringstedt, T., Bengzon, J., Kokaia, M., Siesjö, B.K., Persson, H., Lindvall, O., *Rapid increase of BDNF mRNA levels in cortical neurons following spreading depression: regulation by glutamatergic mechanisms independent of seizure activity*. Brain Res Mol Brain Res, 1993. 19(4): p. 277-86.
- Kokaia, Z., Andsberg, G., Yan, Q., Lindvall, O., *Rapid alterations of BDNF protein levels in the rat brain after focal ischemia: evidence for increased synthesis and anterograde axonal transport*. Exp Neurol, 1998. 154(2): p. 289-301.
- Yoshimura, N., Kikuchi, T., Kuroiwa, S., Gaun, S., *Differential temporal and spatial expression of immediate early genes in retinal neurons after ischemia-reperfusion injury*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. 44(5): p. 2211-20.
- Herdegen, T., Sandkuhler, J., Gass, P., Kiessling, M., Bravo, R., Zimmermann, M., *JUN, FOS, KROX, and CREB transcription factor proteins in the rat cortex: basal expression and induction by spreading depression and epileptic seizures*. J Comp Neurol, 1993. 333(2): p. 271-88.
- Wang, X., Barone, F.C., White, R.F., Feuerstein, G.Z., *Subtractive cloning identifies tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) increased gene expression following focal stroke*. Stroke, 1998. 29(2): p. 516-20.
- von Gertten, C., Holmin, S., Mathiesen, T., Nordqvist, A.C., *Increases in matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA after cerebral contusion and depolarisation*. J Neurosci Res, 2003. 73(6): p. 803-10.
- Yokota, N., Uchijima, M., Nishizawa, S., Namba, H., Koide, Y., *Identification of differentially expressed genes in rat hippocampus after transient global cerebral ischemia using subtractive cDNA cloning based on polymerase chain reaction*. Stroke, 2001. 32(1): p. 168-74.
- Shen, P.J., Gundlach, A.L., *Differential increases in chromogranins, but not synapsin I, in cortical neurons following spreading depression: implications for functional roles and transmitter peptide release*. Eur J Neurosci, 1998. 10(7): p. 2217-30.
- Sasaki, T., Iwata, S., Okano, H.J., Urasaki, Y., Hamada, J., Tanaka, H., Dang, N.H., Okano, H., Morimoto, C., *Nedd9 protein, a Cas-L homologue, is upregulated after transient global ischemia in rats: possible involvement of Nedd9 in the differentiation of neurons after ischemia*. Stroke, 2005. 36(11): p. 2457-62.
- Wiggins, A.K., Shen, P.J., Gundlach, A.L., *Atrial natriuretic peptide expression is increased in rat cerebral cortex following spreading depression: possible contribution to sd-induced neuroprotection*. Neuroscience, 2003. 118(3): p. 715-26.
- Aoki, K., Uchihara, T., Tsuchiya, K., Nakamura, A., Ikeda, K., Wakayama, Y., *Enhanced expression of aquaporin 4 in human brain with infarction*. Acta Neuropathol (Berl), 2003. 106(2): p. 121-4.
- Taniguchi, M., Yamashita, T., Kumura, E., Tamatani, M., Kobayashi, A., Yokawa, T., Maruno, M., Kato, A., Ohnishi, T., Kohmura, E., Tohyama, M., Yoshimine, T., *Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat*. Brain Res Mol Brain Res, 2000. 78(1-2): p. 131-7.

Tabelle B Transkripte, die 24 h nach Spreading depression (SD) mindestens 2-fach differentiell exprimiert waren. Schattiert = ähnliche Expression nach SD bereits aus Literatur bekannt; Fett = Änderung entspricht der im ipsilateralen *remote* Kortex nach fokaler Ischämie; x = Regulation bekannt aus Literatur zu Änderungen in post-ischämischem Gewebe. Für Gene, die aus früheren Studien im Zusammenhang mit SD oder Ischämie bekannt waren, sind die entsprechenden Referenzen angegeben.

Gen	Public ID	Gensymbol	Fold change				Referenzen	
			3h	24h	7d	30d		
Hochregulierte mRNAs								
x	heat shock 27kDa protein 1	NM_031970	HSPB1 / hsp27	1.7	7.5	-	-	[1-5]
	H19 fetal liver mRNA	BF284168	H19	-	4.6	-	-	
x	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	NM_053819	TIMP1	9.2	4.3	8.0	-	[1]
	lectin, galactose binding, soluble 3	NM_031832	LGALS3	-	4.3	2.0	-	
x	CD44 antigen	NM_012924	CD44	-	4.0	-	-	[1, 3]
x	CD44 antigen	BI302830	CD44	-	4.0	-	-	[1, 3]
	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	BI303379	TNFRSF12A	1.9	3.5	-	-	
	Transcribed locus	BF389682	---	3.0	3.5	-	-	
x	CD44 antigen	AF065147	CD44	-	3.5	1.5	-	[1, 3]
	epithelial membrane protein 1	BI275741	EMP1	2.1	3.2	-	-	
	actin, beta	NM_031144	ACTB	1.5	3.2	-	-	
	similar to RIKEN cDNA D130074J02 gene (predicted)	BI276946	---	1.5	3.0	-	-	
x	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	NM_024127	GADD45α	1.3	2.8	-	-	[1, 3]
	Similar to small proline-rich protein gene	BI286387	SPRR1	1.5	2.8	3.0	-	
	Transcribed locus	BG378095	---	1.4	2.8	-	-	
	---	AI705744	---	1.5	2.8	-	-	
	glycoprotein 38	NM_019358	GP38	-	2.6	1.6	-	
	signal transducer and activator of transcription 3	BI285863	STAT3	2.5	2.5	-	-	
x	synaptotagmin 4	L38247	SYT4	4.3	2.5	-	-	[6]
	similar to Antxr2 protein	AI013888	---	2.5	2.5	-	-	
	Similar to RECS1	BI292351	---	-	2.3	-	-	
	Transcribed locus	BI282755	---	-	2.3	-	-	
	reversion induced LIM gene	NM_017062	RIL	-	2.3	1.5	-	
x	calponin 3, acidic	BI274457	CNN3	-	2.3	1.3	-	[1]
	similar to chromosome 14 open reading frame 35	BI298587	---	1.4	2.3	-	-	
	actin, beta	NM_031144	ACTB	1.3	2.3	-	-	
	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1 (predicted)	BG381219	HNRPUL1	1.2	2.3	-	-	
	CTD-binding SR-like rA1	NM_019384	---	1.9	2.1	-	-2.1	
	solute carrier family 10, member 2	NM_017222	SLC10A2	-	2.1	-	-	
	claudin 11	NM_053457	CLDN11	1.4	2.1	-	-1.6	
	hyaluronan and proteoglycan link protein 2 / brain link protein 1	AI145465	BRAL1	1.2	2.1	-1.1	-	
	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	X77194	CAMK2D	1.3	2.1	-	-	
	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1	BI284436	EIF4A1	1.5	2.1	-	-	
	Death associated transcription factor 1 (predicted)	BI275251	---	-	2.1	-	-	
	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2	BF288097	PPP1R2	1.5	2.1	-	-	
x	S100 calcium binding protein A10 (calpactin)	NM_031114	S100A10	-	2.1	-	-	[1]
	methionine adenosyltransferase II, alpha	NM_134351	MAT2A	2.0	2.1	-	-	
x	Jun-B oncogene	NM_021836	JunB	10.6	2.1	-	-	[3]
	interferon induced transmembrane protein 3	BI285494	IFITM3L	2.0	2.1	1.4	-	
	Filamin C, gamma (actin binding protein 280) (predicted)	AI103600	---	-	2.1	-	-	
	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_021989	TIMP2	1.3	2.0	1.4	-	
	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	NM_057141	HNRPK	-	2.0	-	-	
	Serine protease inhibitor	NM_031531	SPIN2C	-	2.0	-	-	
	calcium-independent alpha-latrotoxin receptor homolog 3	AF081159	CIRL3	-	2.0	-	-	
x	heme oxygenase 1	NM_012580	HMOX1 / hsp32	1.2	2.0	-	-	[3, 5, 7, 8]
	activating transcription factor 5	BM391471	ATF5	-	2.0	-	-	

SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	BE111847	SMARCA4	-	2.0	2.1	-1.4
transformed mouse 3T3 cell double minute 2 (predicted)	BI296301	MDM2	2.0	2.0	-	-
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2	AW919998	PPP1R2	-	2.0	-	-
H3 histone, family 3B	AI177503	H3F3B	1.4	2.0	-	-
damage-specific DNA binding protein 1	AJ277077	DDB1	-	2.0	-	-
<i>Herabregulierte mRNAs</i>						
camello-like 3	AF187814	CML3	-	-3.0	-1.6	-
transthyretin	NM_012681	TTR	1.6	-2.5	1.4	5.3
---	BI287300	HBB	-	-2.5	-	-
albumin	NM_134326	ALB	-1.9	-2.3	-	-
carbonic anhydrase 3	NM_019292	CA3	-	-2.3	-	-
homer, neuronal immediate early gene, 1	AF030088	Homer1	14.9	-2.1	-	-
Transcribed locus	AA818819	---	-1.4	-2.1	-	-
glutaminase 2 (liver, mitochondrial)	J05499	GA	-	-2.0	-1.3	-
similar to RIKEN cDNA 9230117N10 (predicted)	AI716248	---	-	-2.0	-	-
Similar to hypothetical protein B230399E16	BE113272	---	-	-2.0	-	-
sideroflexin 5	AI575254	SFXN5	-	-2.0	-	-
camello-like 5	AI717047	CML5	-	-2.0	-	-

1. Tang, Y., et al., *Genomic responses of the brain to ischemic stroke, intracerebral haemorrhage, kainate seizures, hypoglycemia, and hypoxia*. Eur J Neurosci, 2002. **15**(12): p. 1937-52.
2. Plumier, J.C., et al., *Cortical application of potassium chloride induces the low-molecular weight heat shock protein (Hsp27) in astrocytes*. J Cereb Blood Flow Metab, 1997. **17**(7): p. 781-90.
3. Lu, A., et al., *Genomics of the periinfarction cortex after focal cerebral ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. **23**(7): p. 786-810.
4. Plumier, J.C., et al., *Differential expression of c-fos, Hsp70 and Hsp27 after photothrombotic injury in the rat brain*. Brain Res Mol Brain Res, 1997. **45**(2): p. 239-46.
5. Lu, X.C., et al., *Microarray analysis of acute and delayed gene expression profile in rats after focal ischemic brain injury and reperfusion*. J Neurosci Res, 2004. **77**(6): p. 843-57.
6. Yokota, N., et al., *Identification of differentially expressed genes in rat hippocampus after transient global cerebral ischemia using subtractive cDNA cloning based on polymerase chain reaction*. Stroke, 2001. **32**(1): p. 168-74.
7. Koistinaho, J., et al., *Spreading depression-induced gene expression is regulated by plasma glucose*. Stroke, 1999. **30**(1): p. 114-9.
8. Nimura, T., et al., *Heme oxygenase-1 (HO-1) protein induction in rat brain following focal ischemia*. Brain Res Mol Brain Res, 1996. **37**(1-2): p. 201-8.

Tabelle C Transkripte, die 7 Tage nach Spreading depression (SD) mindestens 2-fach differentiell exprimiert waren.

Gen	Public ID	Gensymbol	Fold change			
			3h	24h	7d	30d
<i>Hochregulierte mRNAs</i>						
tissue inhibitor of metalloproteinase 1	NM_053819	TIMP1	9.2	4.3	8.0	-
similar to Cornifin alpha (small proline-rich protein gene)	BI286387	SPRR1	1.5	2.8	3.0	-
inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II	U96920	INPP4B	-	-	2.3	-
protease, serine, 23	AI177099	Prss23	-	-	2.1	-
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	BE111847	SMARCA4	-	2.0	2.1	-
CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility class II antigen-associated)	NM_013069	CD74	-	-	2.0	-
glycoprotein (transmembrane) NMB	NM_133298	GNMB	-	1.9	2.0	-
Transcribed locus	AI413058	---	-	-	2.0	-
lectin, galactose binding, soluble 3	NM_031832	LGALS3	-	4.3	2.0	-
Transcribed locus	AI179665	---	-	-	2.0	-
<i>Herabregulierte mRNAs</i>						
cerebellin 2 precursor protein (predicted)	AA817812	Cbln2	1.5	-	-2.1	-
FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog / c-fos oncogene	BF415939	c-Fos	19.7	-	-2.0	-
RAS, dexamethasone-induced 1	AF239157	RASD1 / DEXRAS1	-	-1.9	-2.0	-

Tabelle D Transkripte, die 30 Tage nach Spreading depression (SD) mindestens 2-fach differentiell exprimiert waren.

Gen	Public ID	Gensymbol	Fold change			
			3h	24h	7d	30d
<i>Hochregulierte mRNAs</i>						
Transthyretin	NM_012681	TTR	1.6	-2.5	1.4	5.3
similar to KIAA1731 protein (predicted)	BM386844	---	-	-	-	3.5
frizzled-related protein (predicted)	BM391538	---	-	-	-	2.1
CEA-related cell adhesion molecule 9	NM_053919	CEACAM9	-	-	-	2.0
germinal histone H4 gene	BM986536	---	-	-	-	2.0
<i>Herabregulierte mRNAs</i>						
Transcribed locus, weakly similar to XP_129042.4 similar to ring finger protein 111; Arkadia [Mus musculus]	BF396481	---	-	-	-	-3.7
CTD-binding SR-like rA1	NM_019384	---	1.9	2.1	-	-2.1
Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	NM_012634	PRPS2	-	-	-	-2.0
ATPase, Na+/K+ transporting, beta 2 polypeptide	U45946	ATP1B2	2.0	-	-	-2.0
Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	M55292	NTRK2 / TRKB	3.0	-	-	-2.0

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BrdU	- Bromodeoxyuridin
DC	- „ <i>direct current</i> “ (Gleichstrom; im übertragenen Sinne: Gleichspannung)
DC-Potential	- langsames Summenpotential
DCX	- Doublecortin
HL	- Hinterpfotenkortex
IEG	- Immediate Early Gene
IR	- Immunreaktivität
MA	- Microarray
MCAO	- Okklusion der <i>Arteria cerebri media</i>
MW	- Mittelwert
NeuN	- neuronales nukleäres Antigen
NMDA	- N-Methyl-D-Aspartat
Par1	- primärer somatosensorischer Kortex
PID	- Perinfarktdepolarisationen
PT	- Photothrombose
qRT-PCR	- quantitative Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
RT	- Raumtemperatur
SD	- Spreading Depression
SEM	- Standardfehler (<i>standard error of mean</i>)
TF	- Transkriptionsfaktoren

PUFFER UND CHEMIKALIEN

Injektionen, Perfusion und histologische Färbungen

Anti-freeze-Solution

Phosphatpuffer Stocklösung

Stock I (Base)

42.588 g Na_2HPO_4 (MERCK)

3000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Stock II (Säure)

13.799 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MERCK)

1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Phosphatpuffer

700 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

17.5 ml Stock II

mit 26-30 ml Stock I pH auf 7.4 einstellen

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 1 l auffüllen

150 g Glukose (Roth)

300 ml Ethylenglykol (Fluka)

500 ml Phosphatpuffer pH 7.4

200 mg Natriumazid (Merck)

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 1 l auffüllen

0.1 M Borsäure

6.184 g Borsäure (Roth)

1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

BrdU (Sigma) in 0.9% NaCl (Fresenius)

DAB

Stock: DAB (Sigma) 50 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

200 ml TBS/0.2% Triton

2 ml 50 mg/ml DAB

60 μl 30% H_2O_2

Gelatine

1g Gelatine (Merck)

0.1 g Chrom(III)-Kaliumsulfat $\cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Merck)

200 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

10 min quellen lassen, langsam auf 40°C erwärmen, filtrieren

0.18% H_2O_2

0.6 ml 30 %-ige H_2O_2 (Roth)

100 ml H₂O_{dest}

Kresylviolett

300 ml H₂O_{dest}

1.6326 g Na-Acetat (Merck)

2.88 ml Eisessig (Roth)

100 mg Kresylviolett (Waldeck)

Mowiol

10 g Mowiol 4-88 (Calbiochem)

10 g Mowiol 40-88 (Aldrich)

200 ml PBS

100 ml Glyzerol (Roth)

300 mg DAPCO (Diazabicyclo-Octane; Sigma)

PBS

Phosphatpuffer Stocklösung

Stock I (Base)	Stock II (Säure)
42.588 g Na ₂ HPO ₄ (Merck)	13.799 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (Merck)
238.435 g NaCl (Roth)	79.478 g NaCl (Roth)
3000 ml H ₂ O _{dest}	1000 ml H ₂ O _{dest}

1400 ml H₂O_{dest}

35 ml Stock II

mit ca. 160 ml Stock I pH 7.4 einstellen

mit H₂O_{dest.} auf 2000 ml auffüllen

4% PFA

0.2 M Phosphatpuffer Stocklösung pH 7.4

Stock I (Base)	Stock II (Säure)
28.5 g Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O (Merck)	8.3 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (Merck)
800 ml H ₂ O _{dest}	300 ml H ₂ O _{dest}
mit (II) Komponente (I) auf pH 7.4 titrieren (ca. 200 ml)	

40 g PFA (Riedel-De Häen)

300 ml H₂O_{dest}

6-8 Tropfen 10 M NaOH (Roth)

500 ml 0.2 M Phosphatpuffer

mit H₂O_{dest} auf 1 l auffüllen

filtrieren

10% und 30% Saccharose

10 g bzw. 30 g Saccharose (Roth)

100 ml PBS pH 7.4

10 x TBS

132.2 g TRIS-HCl

19.4 TRIS base

90 g NaCl

mit H₂O_{dest} auf 1l

TBS plus

0.2 % (Immunhistochemie) / 0.1 % (Immunfluoreszenz) Triton X-100 (Merck)

2 % Milchpulver (Roth)

2 % BSA (Fraction V; Sigma)

3 % Serum (entsprechend Sekundärantikörperspezies)

TBS

OP und Präparation**aCSF****aCSF stock**

3.5064 g NaCl (Roth)

147 mg CaCl₂ · 2 H₂O (Merck)

186.5 mg KCl (Merck)

183.0 mg MgCl₂ · 6 H₂O (Merck)

1.5118 g HEPES (Sigma)

86.2 mg NaH₂PO₄ (Merck)

in 470 ml H₂O_{dest} lösen, pH mit NaOH auf 7.4 einstellen, auf 490 ml auffüllen, sterilfiltrieren

500 mM Glukose (50 x)

360.4 mg D-Glukose (Merck)

4 ml H₂O_{dest}

9.8 ml aCSF-stock

200 µl 50 · Glukose

Bengal Rosa

100 mg Bengal Rosa (Aldrich)

10 ml 0.9% NaCl (Fresenius)

3 M KCl

22.374 g KCl (Merck)

100 ml H₂O_{dest}

3 M NaCl

17.532 g NaCl (Roth)

100 ml H₂O_{dest}

Molekularbiologische Analysen**2% Agarosegel für DNA**

2 g Agarose

100 ml 1 x TAE

2 µl 10 mg/ml EtBr

1.2% denaturierendes Agarosegel (FA-Gel)

1.2 g Agarose

10 ml 10x FA-Gelpuffer

90 ml H₂O_{DT}, kochen und dann auf 65°C abkühlen

1.8 ml 37% Formaldehyd

2 µl 10 mg/ml EtBr

0.1% DEPC-Wasser (H₂O_{DT})

1 ml DEPC (Sigma)

1 l H₂O_{dest}

ü. N. rühren, dann nochmals 1 h über Kopf rühren, autoklavieren

0.5 M EDTA pH 8.0

93.06 g EDTA (Titriplex III, Natrium-EDTA · 2H₂O; Merck)

500 ml H₂O_{DT}

ca. 10 g NaOH (Roth)

10x FA-Gelpuffer

41.9 g MOPS, free acid (SIGMA)

6.8 g Na-Acetat · 3 H₂O (SIGMA)

20 ml 0.5 M EDTA

ad 1 l H₂O_{DT}; pH mit NaOH auf 7.0 einstellen.

1x FA-Gel-Laufpuffer

100 ml 10x FA-Gelpuffer

20 ml 37 % Formaldehyd

880 ml H₂O_{DT}

10x Gelladepuffer

5 ml 100 %-iges Glyzerin
2 ml 0.5 M EDTA pH 8.0
50 µl 20 %-ige SDS
20 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung
auf 10 ml mit H₂O_{DT}
aliquotieren, -20°C lagern

5x RNA-Gelladepuffer

16 µl gesättigte wässrige Bromphenolblau-Lösung
80 µl 500 mM EDTA pH 8.0
720 µl 37 % Formaldehyd (Sigma)
2 ml Glyzerin (SIGMA)
3.084 ml Formamid (Sigma)
4 ml 10x FA-Gelpuffer
mit H₂O_{DT} auf 10 ml auffüllen, aliquotieren, -20°C

2.5 mM dNTP

dATP, dGTP, dCTP, dTTP (je 25 µmol in 500 µl [50 mM]; Invitex)
8 ml H₂O_{DT}
aliquotieren, -20°C

5 pmol/µl Primer

20 µl 100 pmol/µl fw-Primer (ROTH)
20 µl 100 pmol/µl rev-Primer (ROTH)
360 µl H₂O_{GIBCO}
aliquotieren, -20°C

50 x TAE pH 8.0

242 g TRIS base (Roth)
57.1 ml Eisessig (Roth)
100 ml 0.5 M EDTA pH 8
auf 1 l mit H₂O_{dest} auffüllen, autoklavieren

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die geltende Promotionsordnung der Fakultät ist mir bekannt.

Ich versichere, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung und auch keine ähnliche oder andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen, noch haben Dritte geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Anja Urbach

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. O.W. Witte für die Möglichkeit, in seinem Labor an diesem sehr interessanten Thema arbeiten zu können. Sein Interesse an den Ergebnissen und dem Fortgang meiner Studien und die anregenden Diskussionen haben mich sehr motiviert.

Herrn Dr. Claus Bruehl danke ich für seine stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft auch über seine Anwesenheit in unserem Labor hinaus. Er gab mir die nötigen Einblicke in die elektrophysiologische Arbeit.

Ich danke Prof. Tim Schallert, University of Texas, Austin, für die freundliche und hilfreiche Unterstützung bei den Verhaltensversuchen. Herrn Dr. Krohn und Frau Süptitz der Core Unit DNA Technologies Leipzig danke ich für die cRNA-Synthesen und Microarray-Hybridisierungen.

Meinen Kollegen danke ich für das gute und stets hilfsbereite Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt dabei Lutz Liebmann, Christian Schmeer, Elena Shanina, Silvio Schmidt, Corinna Haupt, Silke Grass, Christiane Frahm, Christoph Redecker für die regen Diskussionen und die Unterstützung in technischen Fragen. Lutz danke ich vor allem für seine unermüdliche freundschaftliche Hilfsbereitschaft. Claudia Sommer, Jessica Heyder und Svetlana Tausch danke ich für die fachkundige technische Unterstützung.

Einen Dank auch an meine Freunde, die immer mehr an mich geglaubt haben als ich selbst.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie. Sie haben mich immer unterstützt und mir dadurch vieles ermöglicht. Ich danke Euch von ganzem Herzen dafür.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Anja Urbach

Geboren am 13. November 1974 in Erfurt

Schulbildung:

1981-1985	Grundschule, Gebesee
1985-1990	Polytechnische Oberschule „Karl Marx“, Gebesee
1990-1991	Erweiterte Oberschule G.E. Lessing, Erfurt
1991-1993	von-Bulöw Gymnasium Neudietendorf
Juni 1993	Mittlere Hochschulreife, Note „sehr gut“

Ausbildung:

1993-1994	Versicherungskaufmännische Ausbildung
-----------	---------------------------------------

Studium:

1994-2000	Biologiestudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Hauptfach: Zoologie; Nebenfächer: Neurobiologie, Pharmakologie, Mikrobiologie
1999-2000	Diplomarbeit am Zoologischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena: Thema: „Etablierung einer Methode zum immunzytochemischen Nachweis der Phosphoinositid-3-Kinase γ in einer permanenten hämatopoietischen Zelllinie“
Juni 2000	Diplom, Note „sehr gut“
2000-2003	wissenschaftlicher Mitarbeiter an den Instituten für Zoologie und Vaskuläre Biologie und Medizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Promotion:

seit Juni 2003	Promotion, Thema: „Funktionelle Langzeiteffekte kortikaler Spreading Depressions“ Experimentelle Neurologie, Klinik für Neurologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
----------------	---

EIGENE PUBLIKATIONEN

Originalarbeiten

Lötzer K, Spanbroek R, Hildner M, **Urbach A**, Heller R, Bretschneider E, Galczenski H, Evans JF, Habenicht AJ: Differential leukotriene receptor expression and calcium responses in endothelial cells and macrophages indicate 5-lipoxygenase-dependent circuits of inflammation and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(8), 2003

Spanbroek R, Gräbner R, Lötzer K, Hildner M, **Urbach A**, Rühling K, Moos MP, Kaiser B, Cohnert TU, Wahlers T, Zieske A, Plenz G, Robenek H, Salbach P, Kuhn H, Radmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ: Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *PNAS* 100(3), 2003

Urbach A, Bruehl C, Witte OW: Microarray based long term detection of genes differentially expressed after cortical spreading depression. *Eur J Neurosci*, in press

In Vorbereitung

Frahm C, **Urbach A**, Witte OW: GAD transcripts are differentially regulated during postnatal development in the cortex and the hippocampus of rats.

Urbach A, Redecker C, Witte OW: Elevated hippocampal neurogenesis provoked by cortical spreading depression.

Poster

Urbach A, Bruehl C, Divanach A, Witte OW (2004): Cortical gene expression after spreading depression. 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie und Funktionelle Bildgebung, Jena.

Urbach A, Bruehl C, Divanach A, Witte OW (2004): Profiling of early and delayed spreading depression induced gene expression. 34th Annual Meeting of Neuroscience, San Diego/Kalifornien.

Urbach A, Redecker C, Witte OW (2005): Elevated hippocampal neurogenesis provoked by cortical spreading depression. 35th Annual Meeting of Neuroscience, Washington, DC.

Urbach A, Redecker C, Witte OW (2006): Effects of cortical spreading depression on hippocampal neurogenesis and spatial learning in rats. 4th International Symposium: „Neuroprotection and Neurorepair: Cerebral ischemia and stroke“, Magdeburg

Abstracts

Urbach A, Bruehl C, Divanach A, Witte OW: Cortical gene expression after spreading depression. *Klin Neurophys* 4, 2004.